

Toksisitet av 3-MA og CQ på T-47D-celler i kultur

Kan hemming av kreftcellers autofagi bli viktig i fremtidens kreftbehandling? En forstudie.

Reidun Sletten

Eksterne veiledere: Erik O. Pettersen, Nina J. Edin og Stine Christoffersen, Fysisk institutt, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Internveileder: Bjørn Steen Skålhegg, Institutt for medisinske basalfag, Det medisinske fakultet



Prosjektoppgave ved Det medisinske fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

04.04.14

Ved hvilke konsentrasjoner av 3-MA og CQ kan en unngå toksiske effekter hos T-47D-celler i kultur?

© Reidun Sletten

2014

Toksisitet av 3-MA og CQ på T-47D-celler i kultur

Reidun Sletten

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Reduced oxygen levels, hypoxia, is a common feature of solid tumors, and has been shown to reduce therapy outcome and overall survival. Under hypoxia and other stressful conditions, cells activate autophagy, which is a basic cellular process that allows the cells to survive by recycling its own components. Increasing evidence suggests that activation of autophagy plays a crucial role in the resistance of hypoxic cancer cells to therapy, and there is need for more knowledge about the consequences of autophagy modulation.

We wanted to investigate if addition of autophagy inhibitors affected the survival of the breast cancer cell line T47-D under normoxic (21 % O₂) and hypoxic (4 % O₂) growth conditions. The aim was to find the highest concentration of autophagy inhibitors 3-methyladenine (3-MA) and chloroquine (CQ) that could be added to the growth medium without affecting the survival fraction. We also wanted to investigate whether addition of autophagy inhibitor to the growth medium could increase the effect of low dose rate irradiation under hypoxic condition.

We found that CQ had unspecific toxic effects on the cells in concentrations from 10 µM to 10 mM under normoxic conditions. The cells tolerated 3-MA in concentrations from 1 µM to 1 mM well, both under normoxic and hypoxic conditions. Five mM had slight toxic effects under hypoxic conditions. Interestingly, we also found indication of effect by combining the addition of 5mM 3MA to the growth medium with irradiation by addition of [³H]Val to the growth medium.

Innholdsfortegnelse

1	INTRODUKSJON	1
1.1	Oksygen – normoksi og hypoksi	2
1.2	Behandlingsresistens ved hypoksi	5
1.3	Autofagi	7
1.4	Autofagiens mange ansikter	9
1.5	Chloroquine og 3-methyladenine hemmer autofagi	10
1.6	Tritium	11
2	MATERIALER OG METODE.....	12
2.1	Celledyrkning	12
2.2	Autofagihemmere	13
2.3	Lavdoseratebestråling	13
2.4	Hypoksi.....	14
2.5	Koloniforsøk	15
3	RESULTATER	17
3.1	Toksisitet av CQ under normoksiske forhold.....	17
3.2	Toksisitet av 3-MA under normoksiske og hypoksiske forhold.....	21
3.3	Synergieffekt av 3-MA kombinert med lavdoseratebestråling.....	24
3.4	Pericellulær oksygenkonsentrasjon hos cellene dyrket under hypoksiske forhold ...	25
4	Diskusjon.....	28
5	Konklusjon	31
	Litteraturliste	32

1 INTRODUKSJON

Luften et menneske puster inneholder ca. 21 % oksygen (O_2). O_2 -tilførselen til ulike vev er vanligvis proporsjonal med blodets hemoglobin(Hb)-innhold, Hbs O_2 -metning og/eller blodforsyningen til de ulike vevene. Eksperimentelt er det vist at blodet inneholder mindre enn 15 % O_2 , mens vevene blodet grenser til inneholder mellom 4-9 % O_2 . Disse verdiene betegnes som normale O_2 -nivåer eller normoksi. Svikt i én eller flere av faktorene som regulerer O_2 -nivået kan fremkalle det vi kaller hypoksi som beskriver nivåer ≤ 4 % i vevene. Det er vist at det indre miljøet i flere typer av solide svulster er hypoksisk, en tilstand som fungerer som en generell stressfaktor for alle levende celler inklusive kreftceller (White et al. 2009). Paradoksalt nok har det vist seg svært vanskelig å drepe hypoksiske kreftceller, og dessverre er det ofte slik at et lite antall gjenlevende kreftceller er nok til at kreftsykdom kommer tilbake, gjerne mange år etter endt behandling (White et al. 2009). Hypoksi reduserer både tumorkontroll og pasienters generelle overlevelse (Horsman et al. 2012). En har flere holdepunkter for at en av årsakene til at hypoksiske kreftceller er så mye mer resistente er fordi prosessen autofagi aktiveres (White et al. 2009, Levy et al. 2011). Autofagi er en form for cellulær selvspising med resirkulering av egne byggesteiner som hovedmål. Autofagi vil dermed være med på å gjøre en celle mindre avhengig av eksogen næringstilgang og samtidig mer motstandsdyktig for ytre stress. Basert på dette er hemning av autofagi sett på som et mulig mål ved regulering av kreftvekst og utvikling. En har imidlertid sett at autofagi også har tumorsuppressorfunksjon (White et al. 2009, Kondo et al. 2005), det vil si at autofagi hemmer malign utvikling av en celle. Denne tosidigheten gjør at det foreløpig ikke hersker enighet rundt hvordan en best bør gå frem for å påvirke autofagi i kreftbehandling (Levy et al. 2011). Det er ønskelig med mer kunnskap om autofagi og hvilken klinisk konsekvens det har å modulere denne cellulære prosessen.

I denne oppgaven ønsket vi å studere celleoverlevelse, definert som evne til kolonidannelse, hos brystkreftlinjen T-47D etter behandling med autofagihemmer under hypoksiske (4 % O_2) og normoksiske (21 % O_2) forhold. Autofagihemmerne 3-methyladenine og chloroquine ble benyttet, og målet var å finne den høyeste konsentrasjonen cellene kunne dyrkes med uten å redusere overlevelsesfraksjonen. Det er tidligere beskrevet en omvendt oksygeneffekt med høyere dødelighet og større tap av kolonidannende evner hos T-47D celler ved høy (19 %) kontra lav (4 %) O_2 -metning i gassfase (Pettersen et al. 2007). Det har blitt spekulert i om man ved å hemme autofagi kan øke denne effekten ytterligere. Denne oppgavens formål var

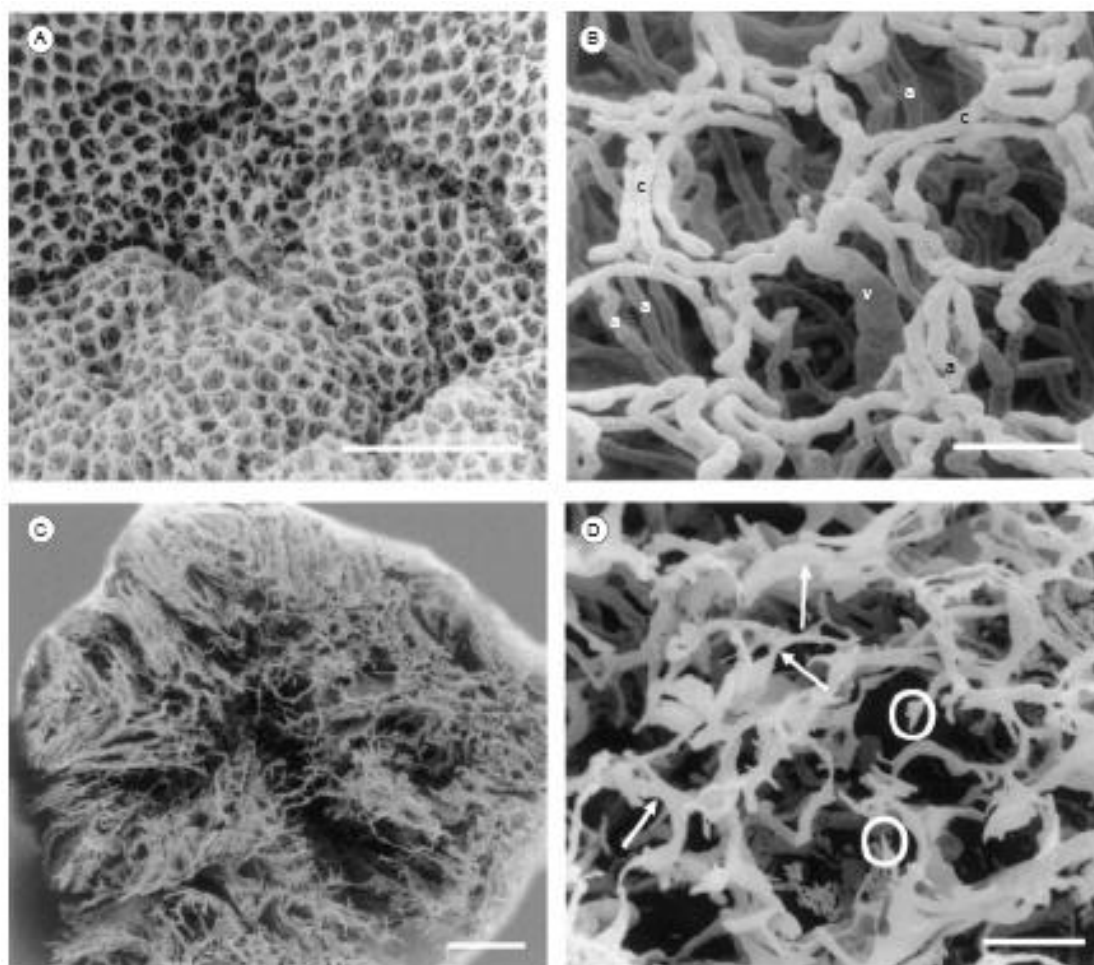
således å finne en egnet autofagihemmer til videre forsøk, samt bestemme hvilken konsentrasjon en helst bør benytte. I tillegg ble det gjort et pilotforsøk der effekten av autofagihemmer i dyrkningsmediet kombinert med lavdosestråling i hypoksi ble undersøkt.

1.1 Oksygen – normoksi og hypoksi

Ved havets overflate er det atmosfæriske trykket 101 kilopascal (kPa) eller 760 mm Hg).

Tjueen (21) % av dette er O_2 , som gir et partialtrykk av O_2 (PO_2) på 21.2 kPa eller 159 mm Hg (McNamee et al. 2013). Ved normal respirasjon vil de røde blodcellene absorbere O_2 med et maksimum trykk i lungekapillærene på 13 kPa eller ~98 mm Hg. Når O_2 leveres til perifere vev vil PO_2 i venøst blod synke til ca. 5.3 kPa eller ~40 mm Hg. I interstitiet (mellom venen og cellene i vevet) vil gjennomsnittlig PO_2 være mellom 2.7–5.3 kPa eller ~20–40 mm Hg. Videre vil intracellulær PO_2 ligge mellom 1.3 og 2.7 kPa eller ~10–20 mm Hg. Dette innebærer at O_2 -trykket i en celle ligger langt under det en finner i atmosfæren. Hypoksi i en celle ligger imidlertid enda lavere enn dette igjen, og er definert som et $PO_2 < 10$ mmHg tilsvarende $< 4\%$ O_2 (Jiang et al. 1996). Disse målingene innebærer at normal O_2 -konsentrasjon i kroppens celler ligger mellom 2-9 % (Simon et al. 2008), et nivå som opprettholdes av kontinuerlig blodtilførsel.

For kreftceller er også vilkår for overlevelse og celledeling best ved tilsvarende konsentrasjoner av O_2 , og ved fullstendig anoksi over tid vil kreftceller dø. Dannelse av nye blodkar, angiogenese, er essensielt for overlevelse og videre vekst av en kreftsvulst (Konerding et al. 2001). Imidlertid ser en i kreftsvulster store områder med hypoksisk vev (Brahimi-Horn et al. 2007). Dette skyldes i hovedsak to forhold; for det første skjer proliferasjon av tumormassen raskere enn angiogenesen slik at avstanden fra kreftcellene til blodkarene som transporterer O_2 blir for stor. I tillegg fungerer angiogenesen dårlig i kreftsvulster (Brahimi-Horn et al. 2007).

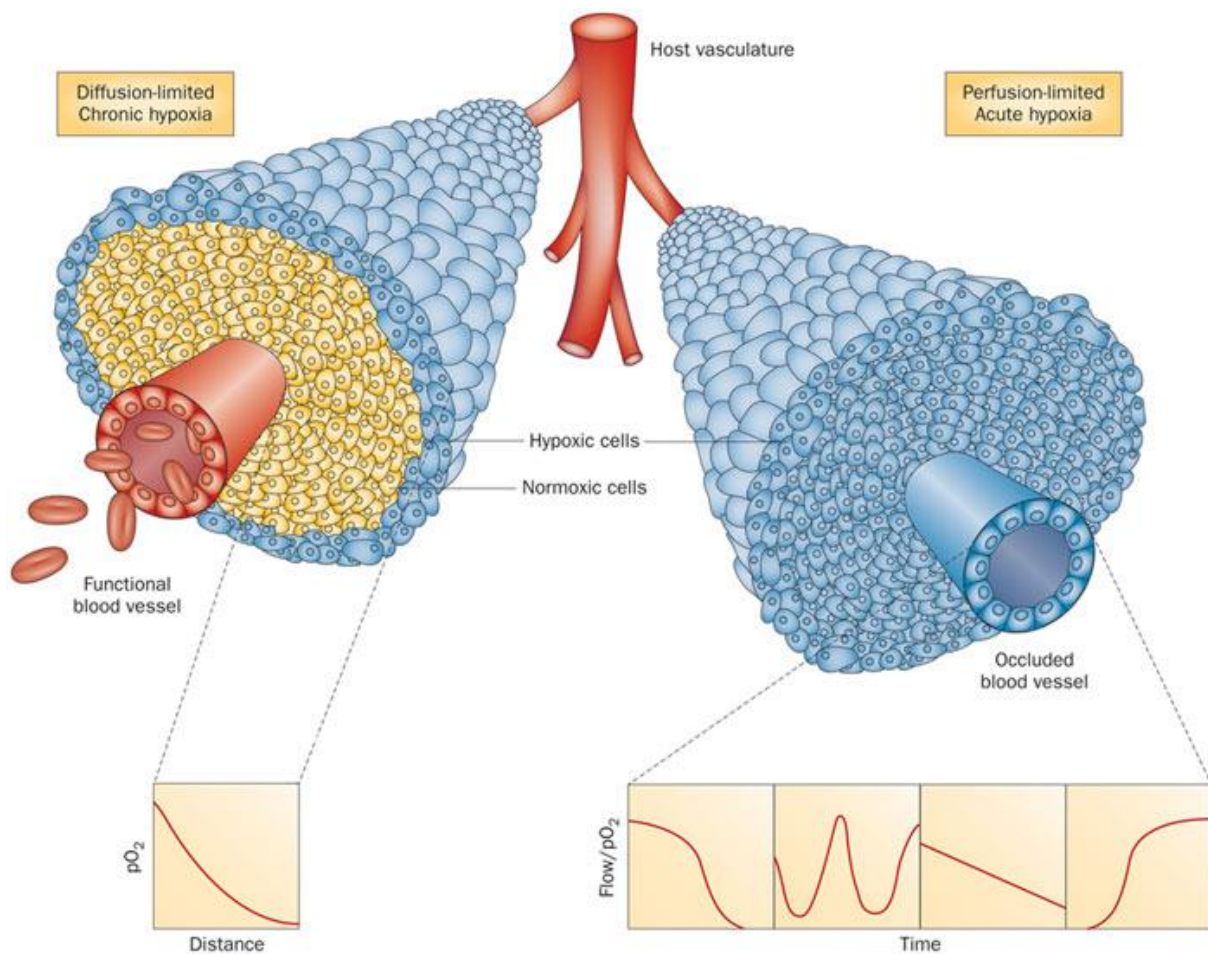


Figur 1, panel A-D. Fotografier fra elektronmikroskop av kolorektal vaskularitet i normal mukosa (A og B) og karsinoma (C og D). Kapillærnettverket i normalmukosa er arrangert i et regelmessig bikubemønster rundt kjertlene i mukosa, slik A og B viser. Denne regelmessigheten er ikke beholdt i kreftsvulster. Her ser en derimot lavere tetthet av blodkar mot sentrum av kreftsvulsten (C), og helt sentralt er det fullstendig avaskulære områder. Nærbilde fra karnettverket i D viser dessuten flere kar som ender blindt (innringet) og at karene er heterogene i tykkelse (piler). (Konerding et al. 2001, modifisert).

Figur 5, panel A-D viser bilder tatt med elektronmikroskop fra kapillærnettverk i normal mukosa i tarm (A og B), samt fra karsinoma (C og D). Bildene illustrerer godt forskjellen i vaskularisering i normalvev sammenlignet med vaskularisering i en kreftsvulst. I mukosa er kapillærnettverket arrangert i et regelmessig bikubemønster (A), og karene er homogene i størrelse (B). I karsinoma er derimot ikke regelmessigheten beholdt (C), en ser lavere tetthet av blodkar mot sentrum av svulsten og helt sentralt er det fullstendig avaskulære områder. Karene i karsinomaet er også heterogene i tykkelse, og flere kar ender blindt (D).

En har beskrevet to hovedformer av hypoksi, kronisk hypoksi og akutt hypoksi (Hall et al. 2006, Horsman et al. 2012). Se figur 2. Denne inndelingen har vist seg å være en overforenkling (Horsman et al. 2012), men er likevel illustrerende som en introduksjon. *Kronisk hypoksi* oppstår gjerne når avstanden fra celle til blodkar er for stor til at tilstrekkelig

oksygenering av nærliggende celler kan skje. Dette vil typisk gjelde celler i randsonen av nekrotisk tumorvev. *Akutt hypoksi* oppstår når et blodkar plutselig stenges. Blodkar i kreftsvulster har en høy grad av malformasjoner og mangler glatt muskulatur (Hall et al. 2006). De har gjerne også både dårlig endotel og delvis manglende basalmembran, noe som medfører at de har særlig ustabil funksjon (Hall et al. 2006). Disse lukkede blodkarene vil gjerne åpnes for blodstrøm igjen etter kort tid, for så midlertidig å stenges på et senere tidspunkt. På denne måten vil forskjellige deler av svulsten være hypoksisk på ulike tidspunkt, og oksygeneringen av kreftcellene fluktuerer (Hall et al. 2006).



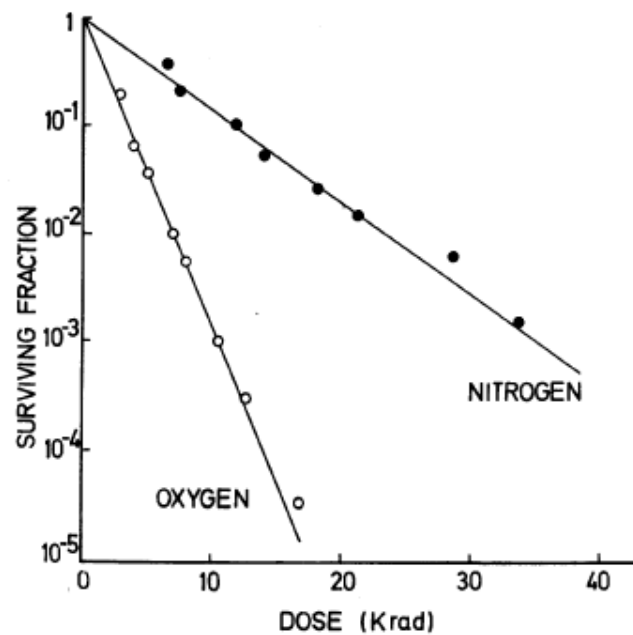
Figur 2. Kronisk hypoksi oppstår når avstanden til blodkar er for stor til at tilstrekkelig O_2 diffunderer til cellene. Akutt hypoksi oppstår i cellene rundt et blodkar når dette midlertidig stenges. (Horsman et al., 2012)

1.2 Behandlingsresistens ved hypoksi

Hypoksi i tumorvev representerer et stort problem i kreftbehandling (Horsman et al. 2012). Effekten av både kjemoterapi og ioniserende stråling er mye dårligere på kreftceller som lever under hypoksiske forhold sammenlignet med kreftceller som er godt oksygenerte. Det er flere ulike årsaker til dette.

O₂ er i seg selv vist å medvirke til skade på celler som bestråles, i radiobiologi kalles dette oksygeneffekten. Selve effekten (at celler bestrålte med O₂ i omgivelsene er mer strålefølsomme enn celler uten O₂ i omgivelsene) i seg selv anses som godt etablert, og er vist for en rekke livsformer. Eksperimentene til Gray og forskergruppen i 1950-årene regnes som klassiske, og viste at O₂ økte strålefølsomheten i flere ulike modellsystem av pattedyrceller (Gray et al. 1953). Eksempler kan gis på tilsvarende funn for andre celletyper, blant annet planterøtter (Read 1952) og bakterier (Michael et al. 1973). Michael og medarbeidere illustrerte i 1973 at tidspunktet for når O₂ tilføres omgivelsene er av betydning for strålefølsomheten. Dersom O₂ ble tilført anoksiske bakterier før, eller opptil 2 millisekunder etter akutt bestråling med elektronpuls, var fraksjonen overlevende¹ bakterier langt lavere enn om O₂ ble tilført senere (Michael et al. 1973). Lignende tidsavhengige effekter ble også beskrevet av andre, blant annet Howard-Flanders og Moore i 1958. Disse funnene er holdepunkter for at tilstedeværelsen av O₂ spiller en betydelig rolle uavhengig av de cellulære prosessene som aktiveres som respons på hypoksiske vekstbetingelser. Anoksiske vekstbetingelser *før* bestråling ga bakteriene ingen beskyttelse dersom O₂ ble tilført i det strålingen ble gitt (Michael et al. 1973).

¹ Bakterier ble skåret som overlevende dersom de, 18 timer etter bestråling, var i stand til å danne en mikrokoloni.



Figur 3 Overlevelsesfraksjon av bakterier av typen *serratia marcescens* bestrålte enten med høy konsentrasjon av O_2 i omgivelsene (oxygen) eller uten O_2 i omgivelsene (nitrogen) (Michael et al. 1973)

Teorien som står sterkest som forklaring på dette betegnes «oksygenfikseringshypotesen» («the oxygen fixation hypothesis»). Det går utover denne oppgaven å forklare hypotesen, og det henvises til bl.a. læreboken «Radiobiology for the Radiologist» (Hall et al., 2006). Kort oppsummert tar teorien utgangspunkt i O_2 -molekylets høye affinitet for elektroner. O_2 -molekylet antas å delta i de kjemiske reaksjonene som forårsaker skaden på DNA-molekylet etter bestråling. O_2 bidrar ved å fiksere stråleskaden. En mener det skjer en spontan kjemisk restitusjon når O_2 ikke er til stede. Oksygeneffekten er i størst grad beskrevet for ioniserende stråling.

I tillegg til denne generelle effekten av O_2 er det beskrevet at celler aktiverer en rekke prosesser som respons på lave oksygennivåer, hypoksi. Gjennom induksjon av transkripsjonsfaktoren hypoxia-inducible transcription factor 1α (Hif- 1α) reprogrammeres cellen til en metabolisme som fungerer ved lav O_2 og lav pH, og induserer som et ledd i dette også autofagi. Totalt sett gjør det cellene mer robuste, mot både stråling, kjemoterapi og andre stressorer (Levy et al. 2011). Selv om det trolig er flere faktorer som spiller inn, er det økende mengde evidens for at aktivering av autofagi er avgjørende for denne økte resistensen (Liu et al. 2010). Autofagi vil behandles nærmere senere i oppgaven.

Omvendt oksygeneffekt

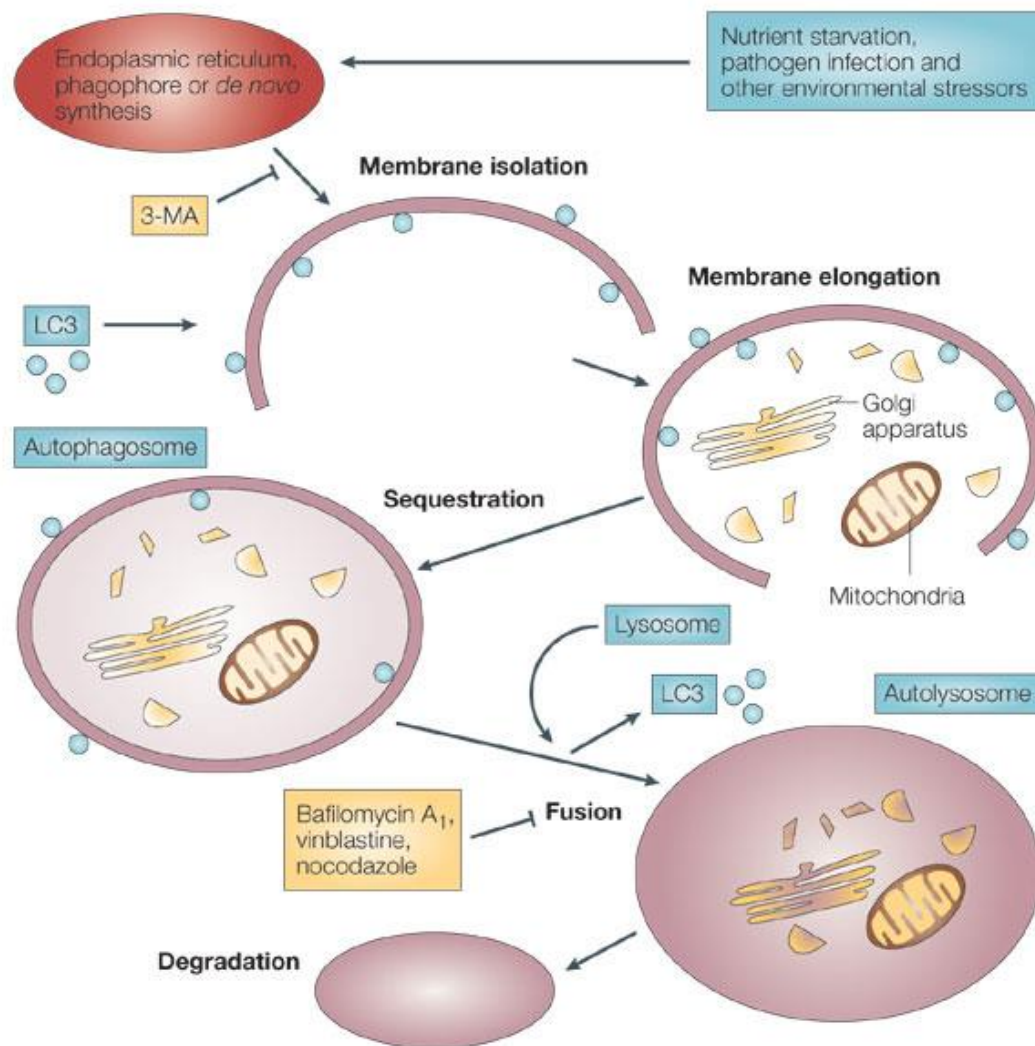
Oksygeneffekten beskrevet over er i all hovedsak påvist i eksperimentelle studier der det er gitt store stråledoser. Det viser seg at cellene ikke har samme respons på bestråling når det benyttes lave doser og at resultatene for høye stråledoser ikke kan overføres direkte til bestråling med lave stråledoser (Skov 1999). For en gjennomgang av denne problemstillingen henvises det til Skov (1999). Interessant nok er det beskrevet en omvendt oksygeneffekt når celler bestråles med lave doserater. Pettersen og forskningsgruppen beskrev i 2007 økt følsomhet hos T-47D-celler for anti-cancer behandling under hypoksiske forhold (Pettersen et al. 2007). I forsøkene ble cellekulturene utsatt for kontinuerlig bestråling på lave doserater (0,015 eller 0,062 Gy/h) ved tilsetning av tritiert valin ($[^3\text{H}]\text{Val}$) i dyrkningsmediet og O_2 -trykket kontrollert til hypoksi. Sammenlignet med cellekulturer behandlet med samme stråledose, viste cellene bestrålt under hypoksi høyere dødelighet og lavere kolonidannende evne.

1.3 Autofagi

Autofagi eller autofagocytose kommer av greske "auto" (selv), "phagein" (å spise) og "kytos" (hul beholder) (Gordh et al., 2001), betydningen av ordet er "å spise seg selv". Autofagi er en katabolsk prosess som kan beskrives skjematisk ved noen viktige hovedledd (Kondo et al. 2005 gir en fin oversikt) (Figur 4). Det første som skjer er at doble lipidmembraner dannes inne i cellen. Etter hvert som disse membranene forlenges og ferdigstilles, rekrutteres proteinstrukturen mikrotubuliassosiert protein 1 lettkjede 3 ("microtubule-associated protein 1 light chain 3"), forkortet LC3, til membranene. Membranene danner autofagosomer som omslutter og fanger inn proteiner i cytoplasma samt organeller som mitokondrier. Autofagosomene modner ved hjelp av en H^+ -ATPase og fusjonerer med lysosomer, disse fusjonerte vakuolene kalles da autolysosomer. De innfangede cellekomponentene og cytoplasmatiske proteinene kan dermed brytes ned av lysosomale hydrolaser og brukes på nytt (Kondo et al. 2005). Autofagi er på denne måten en fysiologisk prosess som regulerer omsetningen av proteiner og organeller (White et al. 2009, Kondo et al. 2005).

Autofagi er et vanlig element i den dagligdagse husholdning (turnover) av proteiner og organeller, men representerer også en ekstra ressurs når cellen utsettes for stress (Kondo et al. 2005). Dette er derfor en mekanisme som er utviklet for å dekke et minimumsbehov hos en

celle med tanke på å reparere skader ved resirkulering og å omfordele energigivende næringsstoffer og viktige byggesteiner når tilgangen ekstracellulært er avbrutt (White et al. 2009). Autofagi er identifisert i alle typer eukaryote celler, fra gjærceller til celler hos pattedyr, og regnes således som en basal cellulær prosess (Kondo et al. 2005).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

Figur 4. Skjematisk fremstilling av autofagi. Stress aktiverer prosessen. Først dannes doble lipidmembraner inne i cellen, når disse ferdigstilles rekrutteres proteinstrukturen LC3 til membranen. Membranene danner autofagosomer, og proteiner og organeller i cytoplasma fanges inn. Autofagosomene modner og fusjonerer med lysosomer, de fusjonerte vakuolene kalles autolysosomer. De innfangede cytoplasmatiske strukturene brytes så ned, og komponentene kan brukes på nytt. (Kondo et al. 2005)

Mange fysiologiske prosesser inne i en celle styres gjennom ekstracellulær påvirkning via hormoner og nevrotransmittere (Alberts et al. 2008). Omformingen av det ekstracellulære signalet til intracellulære prosesser kalles signaltransduksjon. De fleste ekstracellulære signalmolekylene bindes til membranreseptorer på overflaten av en celle. Bindingen forårsaker endringer av reseptorene, som så utløser reaksjonene i de intracellulære signalveiene. Signalveiene består vanligvis av flere ledd og fører ofte til en forsterking av signalet. Dette kalles en signalkaskade som vanligvis er bygd opp av ulike enzymer og ikke-enzymatiske bindingsproteiner (Alberts et al. 2008). Det er identifisert flere intracellulære signalveier som er aktive ved opp- eller nedregulering av autofagi (Kondo et al. 2005). En av signalveiene er fosfatidylinositol-3-kinase (PI3K) protein kinase B (PKB/AKT) og mammalian target of rapamycin (mTOR) -signalveien. Det finnes ulike klasser av PI3K, og det er vist at de ulike klassene regulerer autofagi på forskjellige måter (Kondo et al. 2005, Petiot et al. 2000). PI3K klasse I aktiverer mTOR og hemmer autofagi, mens PI3K klasse III øker graden av autofagi ved å øke innfangning av cytoplasmisk materiale (Kondo et al. 2005, Petiot et al. 2000).

1.4 Autofagiens mange ansikter

Forståelsen av hvordan autofagi fungerer og den fulle forståelsen av effekten av autofagi på hvilende og delende celler er under rask utvikling. Det er ikke enighet om hvordan en bør gå frem for å påvirke autofagi i behandlingen av kreftpasienter, noe som skyldes at det er publisert svært motstridende effekter av aktiv autofagi i kreftceller (Levy et al. 2011). Spesielt utfordrende er det at prosessen på den ene siden virker tumorsuppressivt, samtidig som det på den andre siden ser ut til å støtte kreftcellers evne til å overleve under stress.

Mange tumortyper har defekt eller nedregulert autofagi (White et al. 2009). For eksempel er det ofte alleltap av det essensielle autofagigenet *beclin1* i human bryst-, ovarial og prostatakraft (White et al. 2009). Mus med alleltap av dette genet er mer utsatt for å utvikle hepatocellulært karsinom, adenokarsinom i lunge, hyperplasi i brystceller og lymfom (White et al. 2009). Det er dessuten kjent at økt aktivering av mTOR og PI3-kinase er noen av de hyppigst forekommende hendelsene i humane krefttyper generelt (White et al. 2009), som nevnt i avsnittet over hemmer mTOR autofagi. Dette er eksempler som peker mot at autofagi kan ha en viktig rolle i å motvirke kreftutvikling.

Celler som utsettes for tilstrekkelig stress, for eksempel mangel på næringsstoffer eller O₂, skal normalt gjennomgå programmert celledød, apoptose. I kreftceller er apoptose ofte ikke fungerende, og når de utsettes for tilstander av deprivasjon kan de overleve over lengre tid gjennom autofagi. Ved slike betingelser går de inn i en hviletilstand der celledeling er nedregulert, og autofagi medfører blant annet at cellens størrelse minker til en tredjedel av den opprinnelige (White et al. 2009). Innen 24 timer etter at vekstforholdene er normaliserte kan kreftcellene så gjenoppta celledelingsfunksjon. På denne måten vil aktivering av autofagi gjøre cellene mer motstandsdyktige og bedre rustet til å tåle vanskelige vekstforhold.

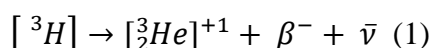
Så hvordan bør en helst modulere autofagi i kreftbehandling? Problemet med den manglende enigheten er spesielt aktuelt nå fordi det er igangsatt flere kliniske forsøk, noen der autofagi hemmes og andre der autofagi stimuleres (Levy et al. 2011); et raskt søk i clinicaltrials.gov med søkeordene "autophagy" and "cancer" gir resultat på 40 kliniske studier. Trolig vil svaret på om man helst bør hemme eller fremme autofagi være forskjellig for forskjellige kreftcellelinjer og ulike behandlingsregimer, og det er nødvendig med mer forskning på autofagi for å få en bedre oversikt.

1.5 Chloroquine og 3-methyladenine hemmer autofagi

Det er flere stoffer som er vist å virke enten hemmende eller aktiverende på ulike trinn i autofagiprosessen. I denne oppgaven ble 3-methyladenine (heretter betegnet 3-MA) og chloroquine (heretter betegnet CQ) benyttet, begge er vist å hemme autofagi, men på noe forskjellige måter. 3-MA ble identifisert som en autofagihemmer av Segler og Gordon i 1982. Senere ble det påvist at mekanismen for virkningen er gjennom å motvirke dannelsen av membranene som skal forme autofagosomer, ved å hemme PI3K (Blommaart et al. 1997). 3-MA er ofte benyttet i eksperimenter på cellekulturer der autofagi moduleres. CQ ble opprinnelig fremstilt som medikament mot malaria, og har vært i bruk til dette formålet siden slutten av 1940-tallet (Thomé et al. 2013). Med tiden har imidlertid mange flere virkninger av CQ blitt påvist, bl.a. kan CQ modulere immunsystemet og hemme autofagi. Hemming av autofagi skjer ved å blokkere fusjon av autofagosom og lysosom (Kondo et al. 2005). CQ benyttes i likhet med 3-MA også i autofagiforsøk på cellekulturer, men er dessuten tatt i bruk i kliniske forsøk (Levy et al. 2011, clinicaltrials.gov).

1.6 Tritium

Tritium [^3H] er en radioaktiv hydrogenisotop som har 1 proton og 2 nøytroner i kjernen. Bindingsenergien mellom elementærpartiklene i kjernen er relativt lav, og som følge av dette er kjernen ustabil. Tritium henfaller til [^3_2He] $^+$ ved utsendelse av et elektron (β^-) og et antinøytrino ($\bar{\nu}$), og reaksjonen kan settes opp slik:



Halveringstid er $\lambda = 12,43$ år, gjennomsnittsenergien til β -partikkelen er 5,6 keV (kiloelektronvolt) og maksimumsenergien 18,6 keV (Goodhead 2009). Gjennomsnittlig rekkevidde for β -partikkelen er 0,56 μm og maksimal rekkevidde er 7 μm (Goodhead 2009). Diameteren av en T-47D-celle er 14 ± 1 μm (Aspmodal 2011). Basert på dette er det antatt at det i praksis ikke er noen stor fare for ekstern strålerisiko med tritium inkorporert i cellestrukturer.

Valin (Val) er en essensiell aminosyre som tas opp i cellene og blir en del av dennes proteinstrukturer. Det er vanlig å koble tritium [^3H] på Val ($[^3\text{H}]\text{Val}$) når det er ønske om å bestråle en celle innenfra.

2 MATERIALER OG METODE

2.1 Celledyrkning

Brystkreftceller fra cellelinjen T-47D ble dyrket i monolag i 25 cm² sterile plastflasker (Nunc A/S, Roskilde, Danmark) og inkuberte ved 37 °C i en atmosfære med 100 % vannmetning og 5 % CO₂. Normoksiske vekstforhold (21 % O₂) ble etablert med CO₂-inkubator (National Heinicke Company, USA) etablering av hypoksiske (4 % O₂) forhold er beskrevet under. Dyrkningsmediet var NaHCO₃-bufret RPMI-medium (JHR Biosciences, USA) tilsatt 10 % varmeinaktivert føtalt kalveserum (Euroclone, England), 1 % penicillin (Euroclone, England), 1 % streptomycin (Euroclone, England), 1 % L-glutamin (JHR Biosciences, USA) og 0,2 % insulin (Sigma, USA). Dette mediet betegnes heretter komplett RPMI. T-47D er en etablert cellelinje isolert fra pleuraeffusjonsvæske hos en pasient med brystkreft (Keydar et al. 1979), T-47D har mutasjoner i gener for tumor protein 53 (Tp53) (Bartek et al. 1990) og phosphoinositide-3-kinase (PIK3CA) (Bachman et al. 2004).

Cellekulturene omsettes/splittes rutinemessig 2 ganger i uken for å opprettholde eksponentiell vekst. Cellene ble i de fleste av forsøkene dyrket i 7 dager med behandling ved tilsetning av autofagihemmer alene eller autofagihemmer kombinert med ([³H]Val) i dyrkningsmediet. Ubehandlete kontrollceller ble dyrket under samme forhold som øvrige cellekulturer i de respektive forsøkene, men uten autofagihemmer eller ([³H]Val). Etter at behandlingstiden var over ble celler fra alle kulturene, både behandlede og ubehandlede, høstet og sådd ut i koloniforsøk. Prosedyren var den samme både når cellene ble dyrket under normoksiske og hypoksiske forhold.

I forsøkene med de laveste konsentrasjonene av CQ (1 µM, 5 µM og 10 µM) ble cellene sådd direkte ut i koloniforsøk, dvs. 200 celler per 25 cm² flaske, og CQ ble tilsatt dyrkningsmediet etter at cellene var festet til bunnen. Cellene stod i inkubator totalt 14 dager. Behandlingen ble stanset ved å bytte CQ-holdig medium med medium uten CQ etter hhv. 1, 2, 3, 4 og 5 dager. Dette forsøksoppsettet ble kun fulgt under normoksiske forhold.

Mikroskopering av cellene ble gjort jevnlig, og i enkelte av forsøkene ble cellene fotograferte gjennom mikroskopet. Mikroskopene som ble benyttet var Nikon TMS, Nikon diaphot og

Nikon ECLIPSE TS100 (alle fra Nikon, Tokyo, Japan) og fotografiapparatet var PAXcam 3 med PAX-it software (PAXcam, Ill., USA).

2.2 Autofagihemmere

Det ble benyttet to ulike autofagihemmere: 3-MA (Sigma-Aldrich, produktnummer M9281) og CQ (Sigma-Aldrich, produktnummer C6628). Begge leveres i fast form fra produsenten, og ble løst opp i komplett RPMI før tilsetning i cellenes dyrkningsmedium.

CQ:

CQ har molekylvekt 515,8 g/mol. 10 ml løsning med konsentrasjon 50 mM ble laget ved å veie opp 0,2579 g og blande med 10 ml komplett RPMI. Denne ble fortynnet på følgende måte:

I: 10 ml 50 mM-løsning

II: 1 ml I + 9 ml RPMI (5 mM)

III: 1 ml II + 9 ml RPMI (500 μ M)

IV: 1 ml III + 9 ml RPMI (50 μ M)

3-MA:

3-MA har molekylvekt 149,15 g/mol. 15 ml løsning med konsentrasjon 5 mM ble laget ved å veie opp 0,0112 g 3-MA og blande med 15 ml komplett RPMI.

2.3 Lavdoseratebestråling

Kontinuerlig lavdoseratebestråling av cellene ble utført ved inkorporering ($[^3\text{H}]\text{Val}$) (TRK533, 1,0 mCi/ml, Amersham, England) i cellulære proteiner. $[^3\text{H}]\text{-Val}$ ble tilsatt dyrkningsmediet i konsentrasjonen 1,67 Ci/mol ($5,9 \times 10^{10}$ Bq/mol). Dette tilsvarer en doserate på $0,015 \pm 0,004$ Gy/h (Pettersen et al. 2007). For å holde aktiviteten konstant ble det også tilsatt 1 mM umerket Val til dyrkningsmediet. Fraksjonen med merket valin som befinner seg inne i cellene vil under likevekt da tilsvare fraksjonen med merket Val fritt i

dyrkningsmediet, og umerket Val fra proteinnedbrytning vil ikke påvirke spesifikk aktivitet i mediet.

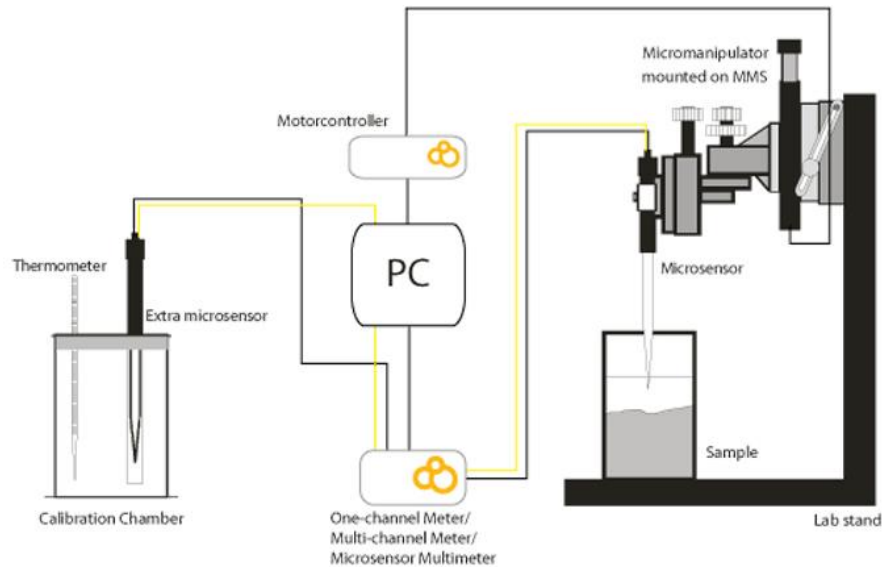
2.4 Hypoksi

Kontinuerlig hypoksiske vekstforhold (kronisk hypoksi) for cellene ble etablert ved bruk av hypoksiboks (InVivo 400, Ruskinn, England), med kontrollert inntak og uttak av gasser. Gassene bestod av 5 % CO₂, ønsket konsentrasjon av O₂ (ved hypoksi ble 4 % benyttet), øvrig gass var N₂. Alt som kom i kontakt med cellene, inklusive medium og trypsin, ble preinkubert i hypoksisk miljø over natten.

Grad av hypoksi pericellulært ble målt med en oksygensensor montert på en mikromanipulator (Unisense, Århus, Danmark), med tilhørende programvare for manipulatorkontroll. Første målepunkt var 2500 µm over flaskebunnen og oksygenkonsentrasjon ble deretter målt i steg på 100 µm. Siste målepunkt, like over cellene, ble anslått ved observasjon i mikroskop (Nikon diaphot, Nikon, Tokyo, Japan). Alle målinger ble lagret i en fil i Microsoft Excel med informasjon om høyde over nullpunkt, signal og nøyaktig tidspunkt etter start. Oksygenkonsentrasjon som funksjon av dybde, kalt oksygenprofil, ble beregnet i Microsoft Excel og fremstilt grafisk i Origin.

Målingene ble utførte i en kultur med T-47D-celler dyrket med 5 mM 3-MA. Cellekulturen med oksygensensoren ønsket vi kun å benytte til oksygenmålinger. Vi høstet enkeltceller for utsåing i koloniforsøk fra en separat cellekultur dyrket med 5 mM 3-MA.

Sensorkalibrering i form av topunktskalibrering ble gjort etter omsetting av cellene og etter skifte av dyrkningsmedium. Sensoren ble kalibrert til nullpunkt i en løsning med 98 % natriumsulfitt (Na₂SO₃) og til boksens atmosfære med 4 % O₂. Programvaren til Unisense beregnet kalibreringen.



Figur 5. Illustrasjon som skjematisk viser Unisense sitt oppsett for måling av oksygenkonsentrasjoner med en oksygensensor montert på en mikromanipulator. Manipulatoren ble styrt med et tilhørende dataprogram installert på PC. Kalibreringen ble i forsøket gjort i en separat operasjon. (Unisense)

2.5 Koloniforsøk

Cellenes overlevelsesfraksjon ble bestemt ved koloniforsøk. Etter endt behandling som beskrevet over, ble enkeltceller fra hver cellekultur høstet og sådd ut. I koloniforsøkene ble det benyttet 5 stk. 25 cm² flasker for hver konsentrasjon, 200 celler i hver flaske.

Celleflaskene ble videre plassert 14 dager i inkubator med 5 % CO₂ under normoksiske forhold og høy vannmetning. Etter endt inkubasjonstid ble antall kolonier bestemt ved telling i lupe (Gerber Instruments, Sveits) etter fiksering med 96 % etanol (Arcus, Norge) og farging med metylenblått (Merck, Tyskland). Kolonier med 50 celler eller flere ble talt med som overlevende. En celle som ikke greier å danne koloni anses som ikke overlevende, eller inaktivert. Ved usikkerhet omkring kolonistørrelsen ble mikroskopering benyttet.

For de laveste konsentrasjonene av CQ (1 µM, 5 µM og 10 µM) var det ingen behandling i forkant av koloniforsøkene, og CQ ble tilsatt dyrkningsmediet til cellene ved starten av koloniforsøkets inkubasjonstid.

Beregning av plating efficiency (PE) og overlevelsesfraksjon (surviving fraction (SF))

Andelen utsådde celler som faktisk klarer å danne kolonier kalles plating efficiency (PE).

$$PE = \frac{N}{N_0},$$

der N er gjennomsnittet av antall kolonier i de behandlede flaskene og N_0 er antall kolonier sådd ut, her 200. Til utregning av overlevelsesfraksjon (SF) i de behandlede celleflaskene korrigerer man for PE fra de ubehandlede kontrollcellene.

$$SF = \frac{C}{C_0} \times \frac{1}{PE},$$

der C er gjennomsnittet av antall kolonier i de behandlede flaskene og C_0 er antall celler sådd ut i de behandlede flaskene. Da man her har sådd ut 200 celler både i kontrollflaskene og de behandlede flaskene, kan ligningen gjøres om til

$$SF = \frac{C}{N}$$

Standardfeil til PE er gitt som

$$se_{PE} = \frac{se_N}{N_0}$$

Standardfeil til SF er da

$$\begin{aligned} se_{SF} &= \sqrt{\left(\frac{\partial SF}{\partial N} \times se_N\right)^2 + \left(\frac{\partial SF}{\partial C} \times se_C\right)^2} \\ &= \sqrt{\left(\frac{-N_0 \times C}{C_0 \times N^2} \times se_N\right)^2 + \left(\frac{N_0}{C_0 \times N} \times se_C\right)^2} \end{aligned}$$

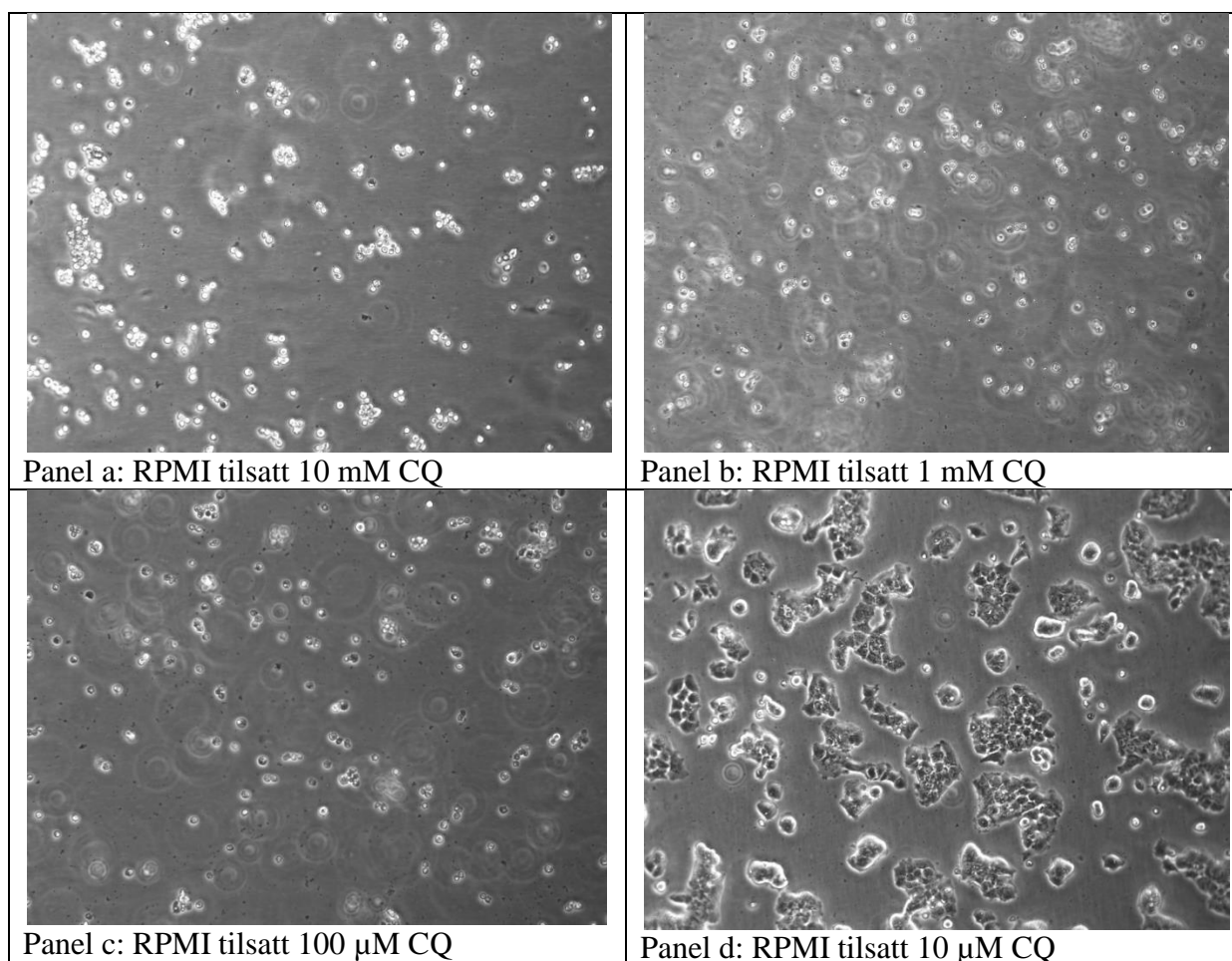
Disse beregningene ble gjort i Microsoft Excel og fremstilt grafisk ved hjelp av Origin.

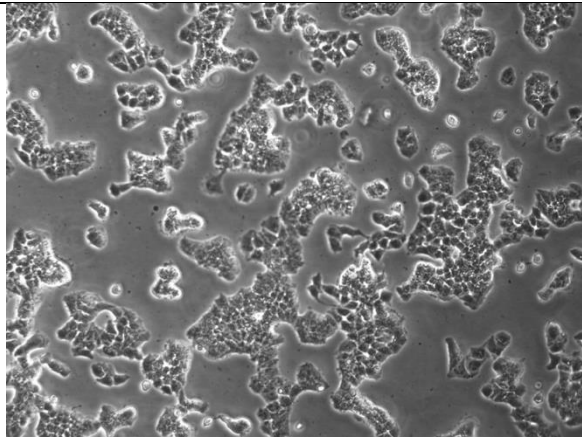
3 RESULTATER

3.1 Toksisitet av CQ under normoksiske forhold

Tilsetning av CQ i dyrkningsmediet til T-47D-celler dyrket under normoksiske forhold ga en betydelig reduksjon i overlevelsesfraksjon. Effekten var konsentrasjonsavhengig i den grad at cellene dyrket med de høyeste konsentrasjonene (fra og med 100 μ M til og med 10 mM) døde før koloniforsøkene kunne gjennomføres. Se figur 6 og 7, panelene a-c.

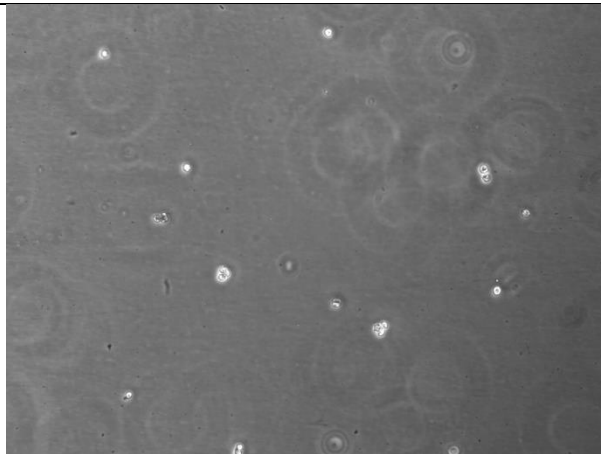
Overlevelsesfraksjonen for de høyeste konsentrasjonene betegnes å være null. Kun cellene dyrket med 10 μ M CQ, samt cellene med nullkonsentrasjonen, kunne undersøkes med koloniforsøk.



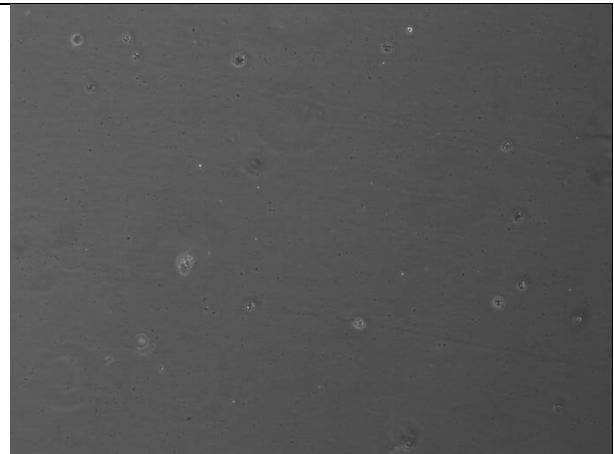


Panel e: Kontroll (K), RPMI uten CQ.

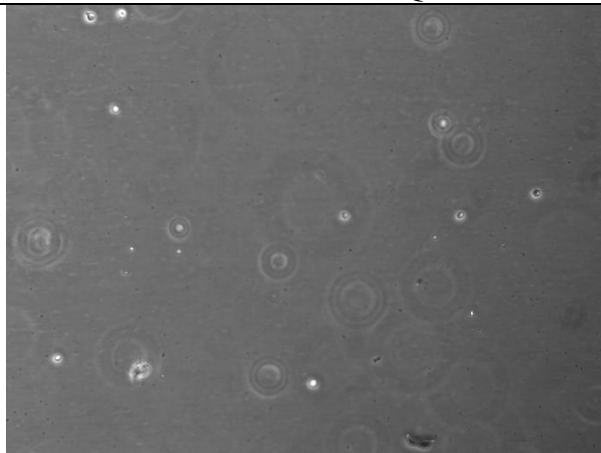
Figur 6, panel a-e. Bilder fra celleflasker med T47-D-celler dyrket med CQ i konsentrasjonene null, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM og 10 mM, og inkubert under normoksiske forhold. Bildene er tatt gjennom et lysmikroskop forsøksdag 3. Tettheten av celler i kulturene avbildet i panel a-c ble anslått til å være lavere enn tettheten av celler i kulturene avbildet i panel d og e, basert på inspeksjon. Celler med 10 μ M CQ og null CQ ble omsatt/splittet. Celler med 100 μ M, 1 mM og 10 mM CQ ble ikke omsatt/splittet.



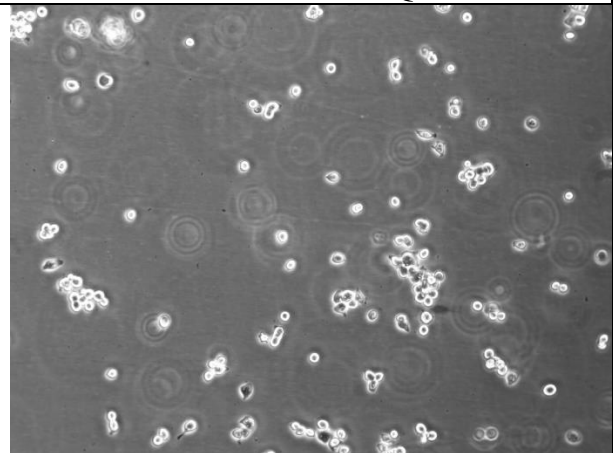
Panel a: RPMI tilsatt 10 mM CQ



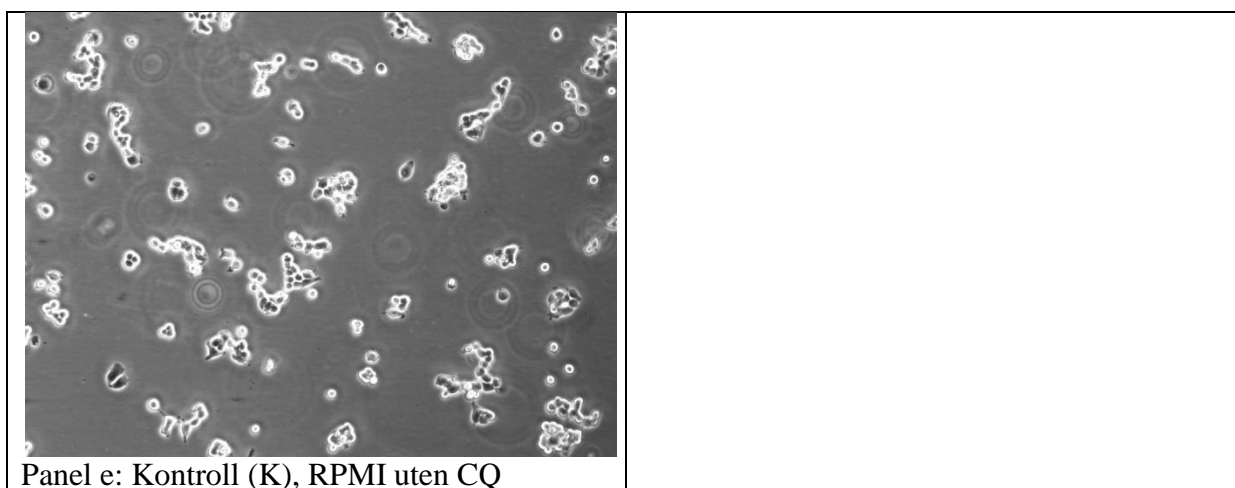
Panel b: RPMI tilsatt 1 mM CQ



Panel c: RPMI tilsatt 100 μ M CQ

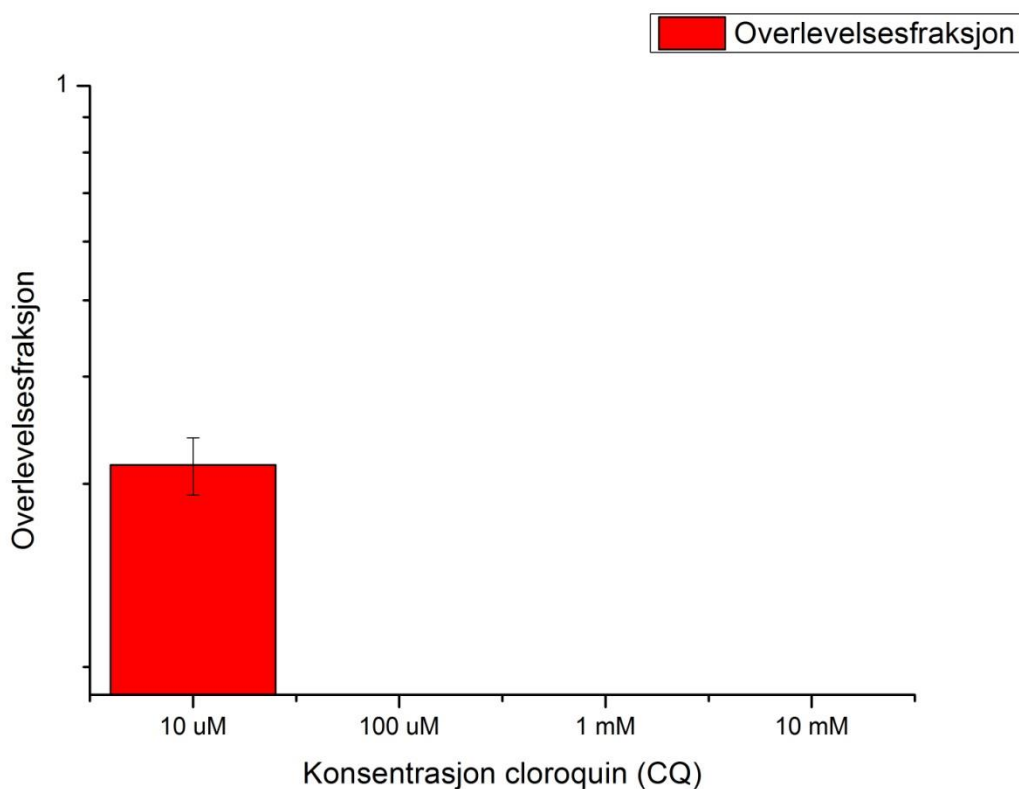


Panel d: RPMI tilsatt 10 μ M CQ



Figur 7 panel a-e. Bilder fra celleflasker med T47-D-celler dyrket med CQ i konsentrasjonene null, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM og 10 mM, og inkubert under normoksiske forhold. Bildene er tatt gjennom lysmikroskop forsøksdag 4. Cellene i kulturene avbildet i panel a-c ble vurdert ved inspeksjon å være døde. Cellene i kulturene avbildet i panel d og e ble vurdert ved inspeksjon å være levende.

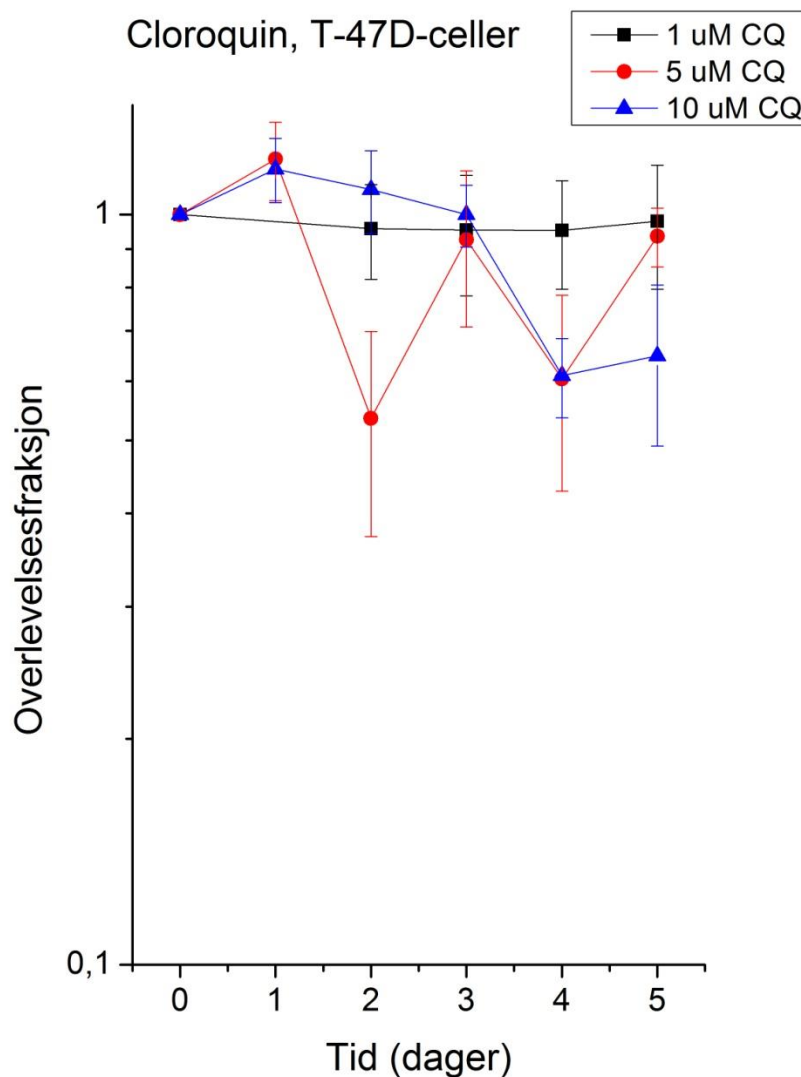
Overlevelsesfraksjonen til cellene dyrket med 10 μ M CQ var $0,24 \pm 0,08$ se figur 8.



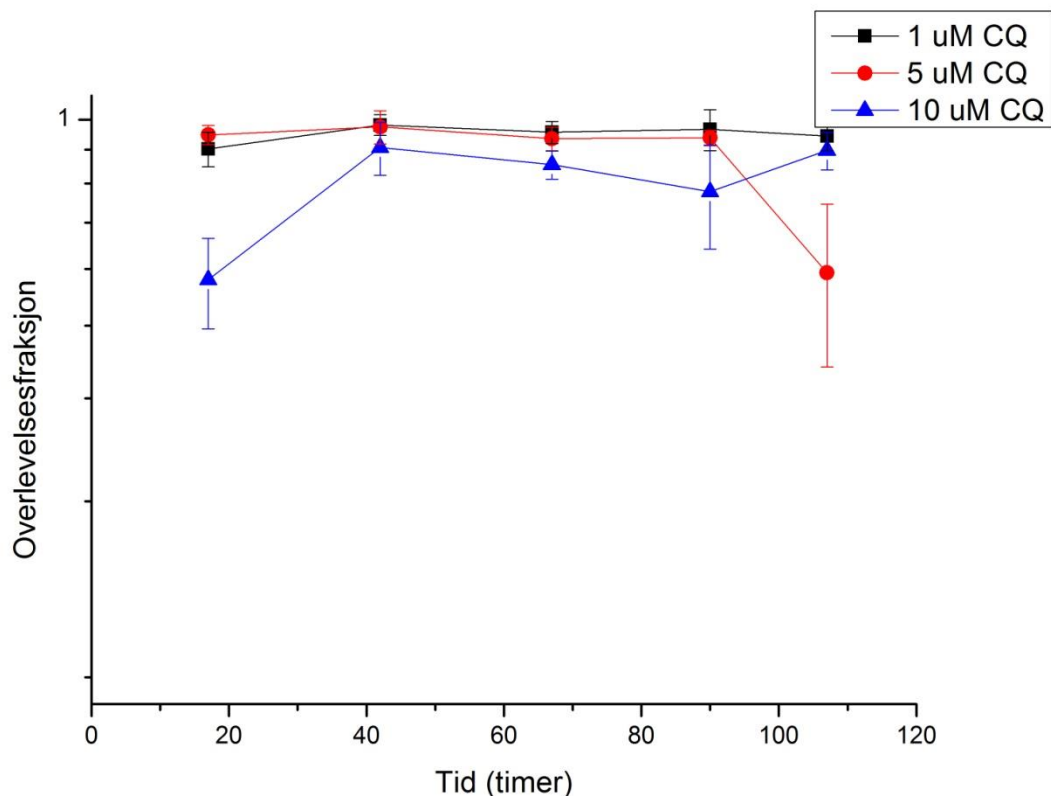
Figur 8. Overlevelsesfraksjon til T-47D-celler som funksjon av konsentrasjon med cloroquin (CQ), standardfeil er markert med bjelke. T-47D-celler ble dyrket i celleflasker med CQ tilsatt dyrkningsmediet i konsentrasjonene null (kontroll), 10 μ M, 100 μ M, 1 mM og 10 mM, og dyrket under normoksiske forhold. Forsøksdag 4 var kun cellene dyrket med 10 μ M CQ, samt celleflasken uten CQ fortsatt i live, de øvrige cellene var døde. Kun celler fra celleflaskene med null og 10 μ M CQ ble sådd ut i koloniforsøk, og antall kolonier ble talt opp etter 14 dagers inkubasjon. Overlevelsesfraksjonen til cellene med konsentrasjonen 10 μ M i mediet var $0,24 \pm 0,08$, beregnet fra antall kolonier fra nullkonsentrasjonen.

Effekten av lavere konsentrasjoner med CQ ble også undersøkt. Oppsettet av forsøket var forskjellig fra alle øvrige forsøk i denne oppgaven, dette er beskrevet under punkt 2.1.

Overlevelsesfraksjonen til celler dyrket med konsentrasjoner på 1 μM , 5 μM og 10 μM varierte fra 0,5 til 1,1 med stor spredning i resultatene, se figurene 9 og 10. Det var ingen klar effekt av varigheten av behandlingen, om cellene ble dyrket i hhv. 1 eller 5 dager påvirket ikke overlevelsesfraksjonen på noen systematisk måte. Eventuelle effekter kan imidlertid være maskerte av store standardfeil.



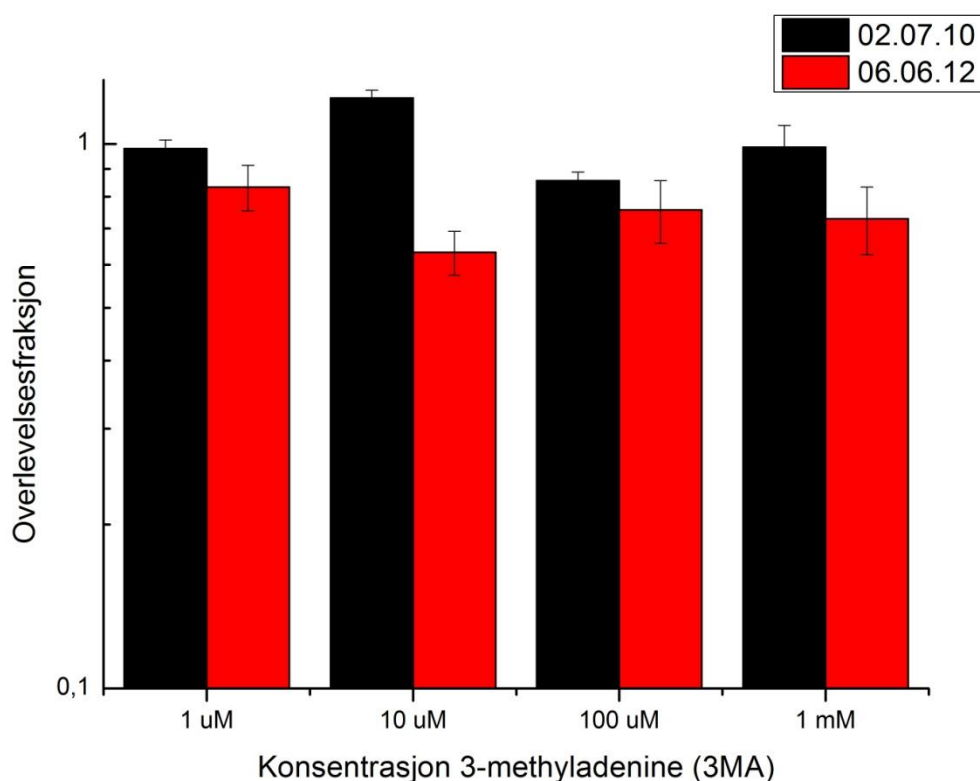
Figur 9. Overlevelsesfraksjon til T-47D-celler som funksjon av tid (dager). Bjelkene viser standardfeil. T-47D-celler ble sådd direkte ut i koloniforsøk med CQ tilsatt dyrkningsmediet i konsentrasjonene null (kontroll), 1 μM , 5 μM og 10 μM . Henholdsvis 1, 2, 3, 4 og 5 dager etter forsøksstart ble CQ-holdig dyrkningsmedium skiftet med medium uten CQ. Alle celleflaskene var inkuberte i totalt 14 dager før koloniene ble fikserte og talt opp. Overlevelsesfraksjon er beregnet fra antall kolonier fra nullkonsentrasjonen.



Figur 10. Overlevelsesfraksjon til T-47D-celler som funksjon av tid (timer). Bjelkene viser standardfeil. T-47D-celler ble sådd direkte ut i koloniforsøk med CQ tilsatt dyrkningsmediet i konsentrasjonene null (kontroll), 1 μ M, 5 μ M og 10 μ M. Det ble sådd ut 200 celler i hver celleflaske og det ble sådd ut i 25 flasker per konsentrasjon bortsett fra nullkonsentrasjonen (kontroll) der det ble sådd ut i 10 flasker. Henholdsvis 1, 2, 3, 4 og 5 dager (figuren viser antall timer) etter forsøksstart ble CQ-holdig dyrkningsmedium skiftet med medium uten CQ. Alle celleflaskene var inkuberte i totalt 14 dager før koloniene ble fikserte og talt opp. Overlevelsesfraksjon er beregnet fra antall kolonier fra nullkonsentrasjonen.

3.2 Toksisitet av 3-MA under normoksiske og hypoksiske forhold

Vi fant ingen endring i overlevelsesfraksjonen til T-47D-celler ved å tilsette 3-MA i dyrkningsmediet i konsentrasjonene 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M og 1 mM og dyrke cellene under normoksiske forhold. Overlevelsesfraksjonen varierte fra 1,21 til 0,63, se figur 11 samt tabellene 1 og 2.



Figur 11. Overlevelsesfraksjon til T-47D-celler som funksjon av konsentrasjon med 3-MA, standardfeil er markert med bjelke. Forsøket ble utført to ganger, de sorte og røde søylene representerer resultater fra hhv. første og andre gjennomføring, dato markert til høyre i figuren. T-47D-celler ble dyrket med 3-MA i konsentrasjonene null (kontroll), 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M og 1 mM under normoksiske forhold i 7 dager før de ble sådd ut i koloniforsøk. Overlevelsesfraksjonen ble beregnet ut fra antall kolonier fra nullkonsentrasjonen.

Konsentrasjon 3-MA	Overlevelsesfraksjon (SF)	Standardfeil (SE)
1 μM	0,98	0,036
10 μM	1,21	0,041
100 μM	0,86	0,032
1 mM	0,99	0,096

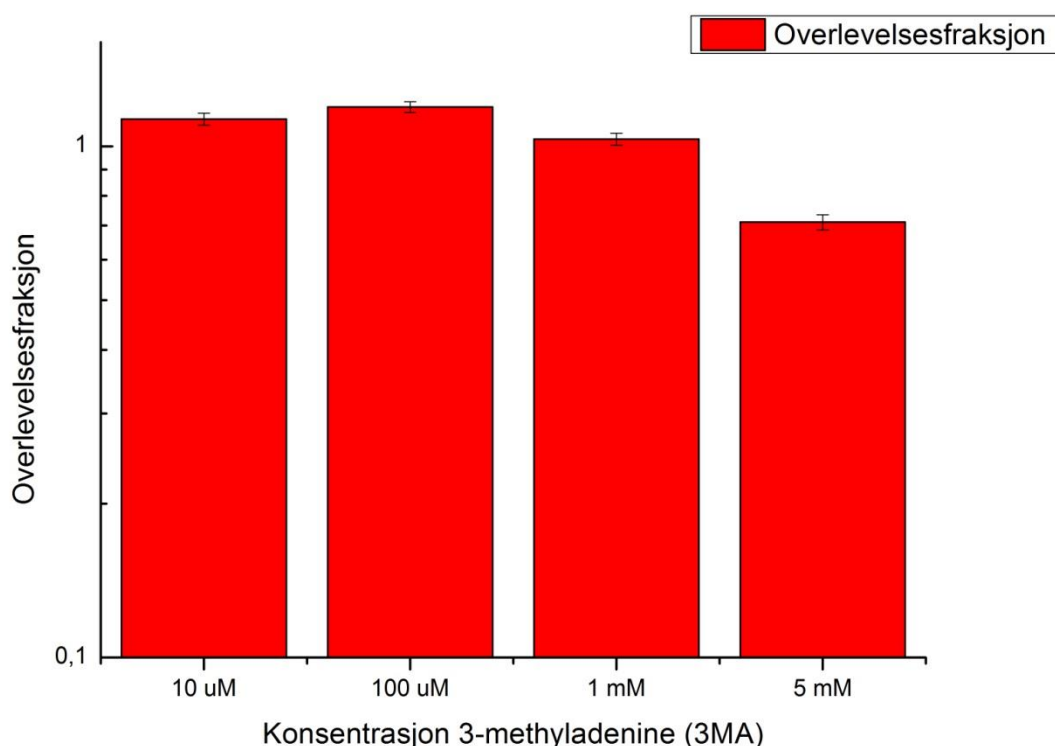
Tabell 1. Overlevelsesfraksjoner (SF) med standardfeil (SE), første forsøk.

Konsentrasjon 3-MA	Overlevelsesfraksjon (SF)	Standardfeil (SE)
1 μM	0,83	0,080
10 μM	0,63	0,058
100 μM	0,76	0,100
1 mM	0,73	0,104

Tabell 2. Overlevelsesfraksjoner (SF) med standardfeil (SE), andre forsøk.

Da vi dyrket T-47D-celler under hypoksiske forhold med 3-MA tilsatt dyrkningsmediet i konsentrasjonene 10 μ M, 100 μ M, 1 mM og 5 mM fant vi reduksjon i overlevelsesfraksjon

for konsentrasjonen 5 mM. For denne konsentrasjonen var gjennomsnittlig overlevelsesfraksjon 0,71. Øvrige konsentrasjoner ga ingen reduksjon i overlevelsesfraksjon, gjennomsnittet varierte fra og med 1,19 til og med 1,03. Se tabell 3.



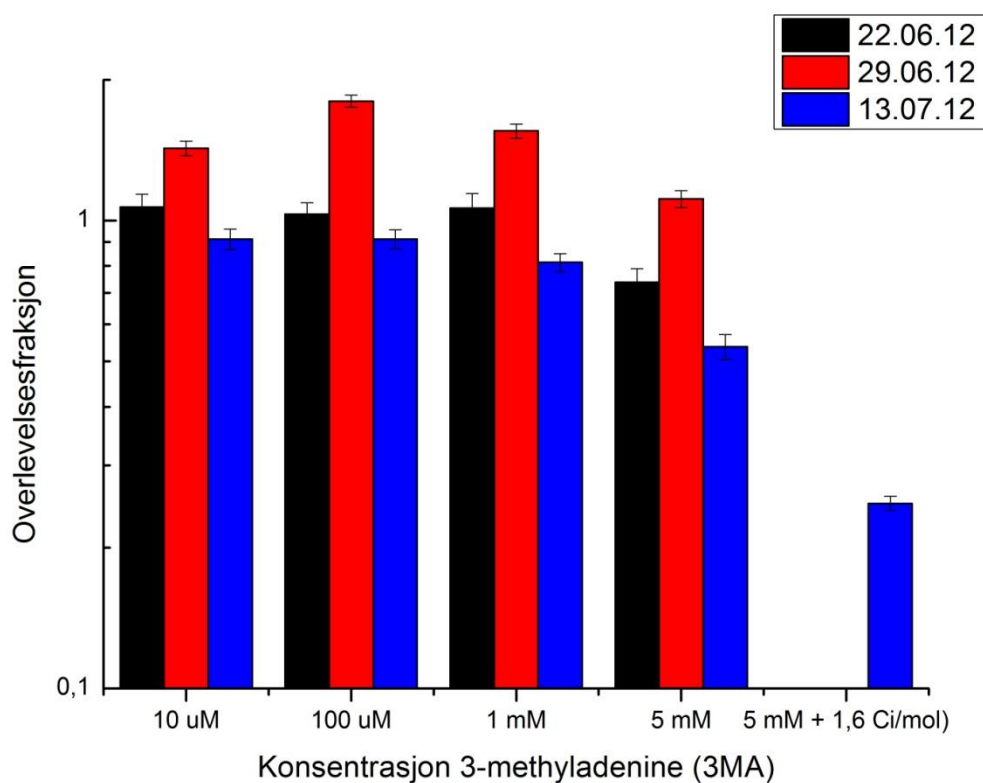
Figur 12. Beregnet gjennomsnitt av overlevelsesfraksjonen til T-47D-celler som funksjon av konsentrasjon med 3-MA, hypoksi. Bjelkene markerer standardfeil. Figuren viser gjennomsnittet av overlevelsesfraksjoner fra tre repetisjoner av samme forsøk. T-47D-celler ble dyrket med 3-MA i konsentrasjonene null (kontroll), 10 µM, 100 µM, 1 mM og 5 mM under hypoksiske forhold i 7 dager før de ble sådd ut i koloniforsøk. Overlevelsesfraksjonen ble beregnet ut fra antall kolonier fra nullkonsentrasjonen.

Konsentrasjon 3 MA	Overlevelsesfraksjon (SF), gjennomsnitt	Standardfeil (SE)
10 µM	1,13	0,031
100 µM	1,19	0,030
1 mM	1,03	0,028
5 mM	0,71	0,025

Tabell 3. Gjennomsnittlige overlevelsesfraksjoner (SF) med standardfeil (SE)

3.3 Synergieffekt av 3-MA kombinert med lavdoseratebestråling

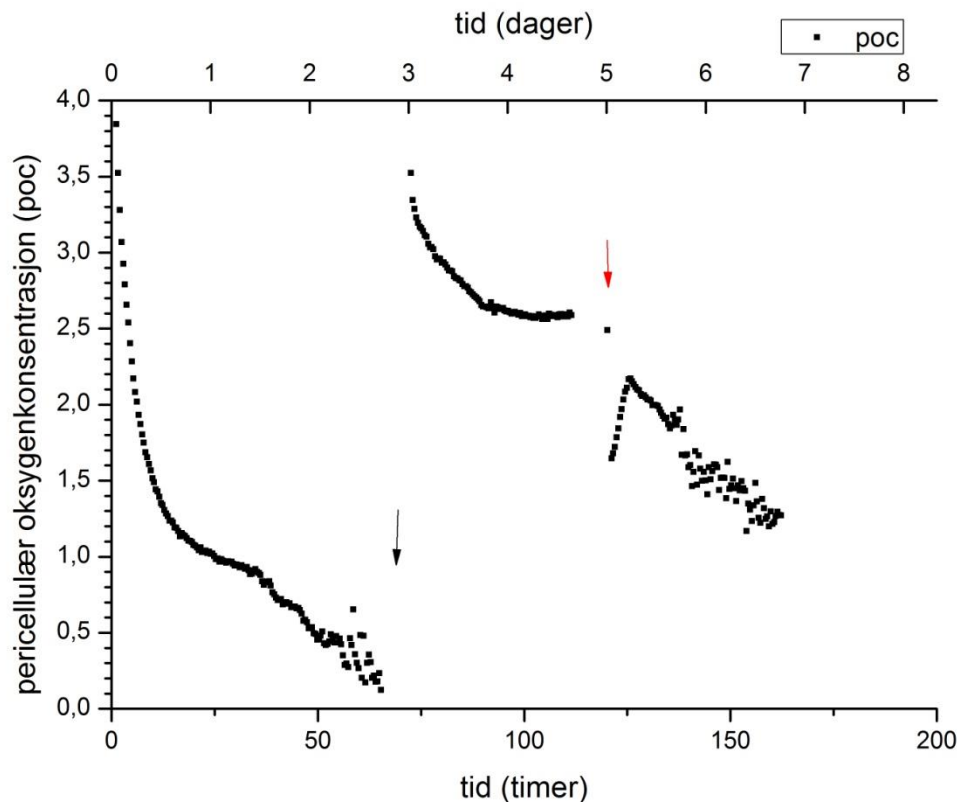
Tilsetning av både [^3H]Val i konsentrasjonen 1,6 Ci/mol og 3-MA i konsentrasjonen 5 mM i dyrkningsmediet til T-47-D-celler dyrket under hypoksiske forhold ga en betydelig reduksjon i overlevelsesfraksjon. Overlevelsesfraksjonen var $0,25 \pm 0,009$, se figur 13. Dette forsøket ble kun gjort én gang. Overlevelsesfraksjonen er derfor ikke sammenlignet med gjennomsnittet av overlevelsesfraksjonene til T-47D-celler dyrket med kun 3-MA under hypoksi, men med resultatene fra enkeltforsøkene.



Figur 13. Overlevelsesfraksjon til T-47D-celler som funksjon av konsentrasjon med 3-MA, standardfeil er markert med bjelke. Forsøket ble utført tre ganger, de sorte, røde og blå søylene representerer resultater fra hvert sitt forsøk, dato for utførelse av forsøkene markert til høyre i figuren. T-47D-celler ble dyrket med 3-MA i konsentrasjonene null (kontroll), 10 µM, 100 µM, 1 mM og 5 mM. I ett av forsøkene ble dessuten én celleflaske med kombinasjonsbehandlingen 3-MA i konsentrasjonen 5 mM og [^3H]Val i konsentrasjonen 1,6 Ci/mol inkludert. Cellene ble dyrket under hypoksiske forhold (4 % O_2) i 7 dager før de ble høstet og sådd ut i koloniforsøk. Overlevelsesfraksjonen er beregnet ut fra antall kolonier fra nullkonsentrasjonen.

3.4 Pericellulær oksygenkonsentrasjon hos cellene dyrket under hypoksiske forhold

Det ble gjennomført én fullstendig registrering av pericellulær oksygenkonsentrasjon (poc) hos cellene dyrket under hypoksiske forhold. Oksygensensoren målte poc hos T-47D-celler dyrket med 5 mM 3-MA under hypoksiske forhold i 7 dager.

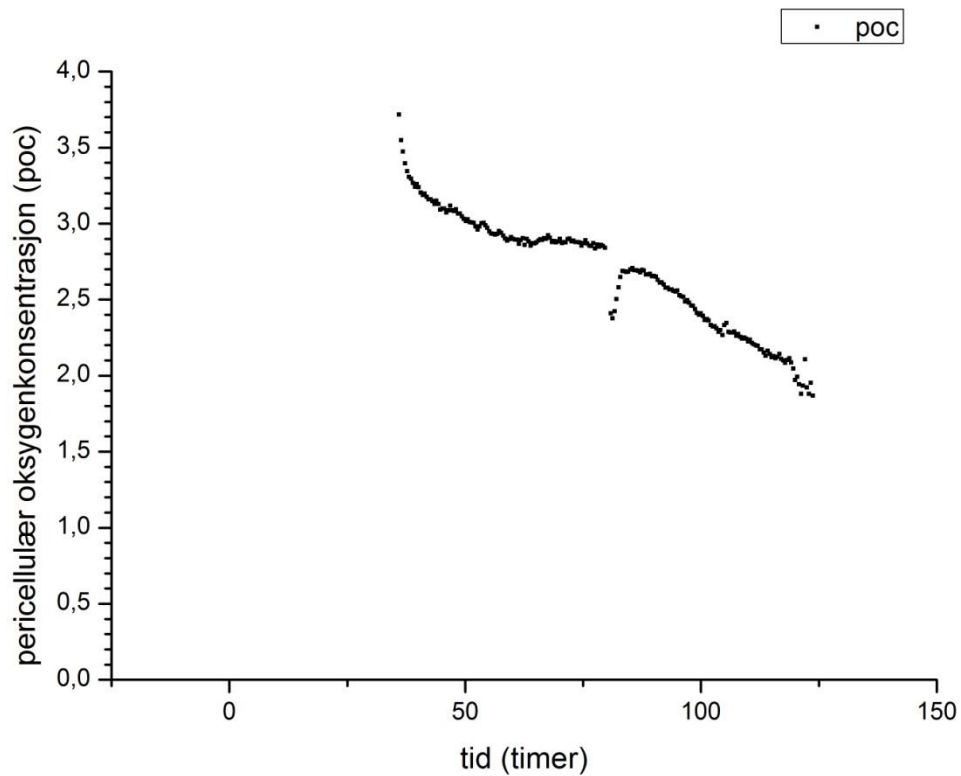


Figur 14. Pericellulær oksygenkonsentrasjon som funksjon av tid angitt både i timer og dager, målt i en celleflaske med T-47D-celler dyrket i hypoksi (4 % O₂) med 5 mM 3-MA tilsatt dyrkningsmediet. Sort pil markerer tidspunkt for omsetting /splitting av cellene, rød pil markerer tidspunkt for mediumskift. Registreringene stopper når behandlingstiden var over og celleflasken tatt ut.

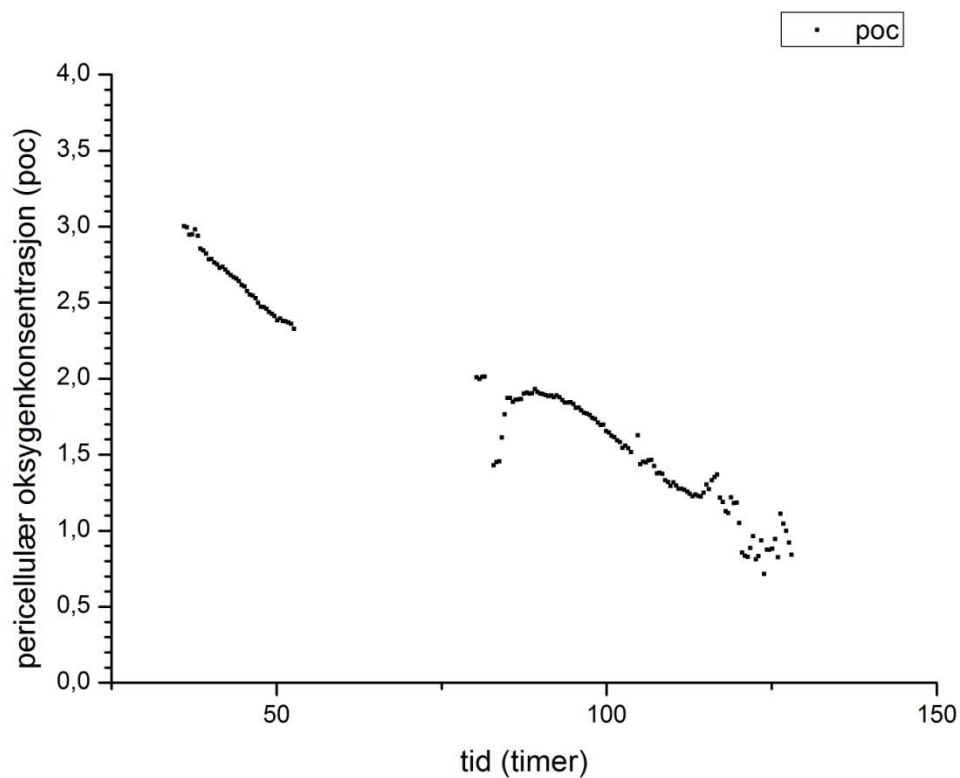
Figur 14 viser at oksygenkonsentrasjonen kom ned i 0,1 % O₂ før omsetting/splitting (markert med sort pil). Etter omsetting/splitting kom ikke oksygenkonsentrasjonen like lavt, men ble liggende litt over 1 % O₂. Registreringene stopper etter en uke fordi behandlingstiden da var over. Enkeltceller fra cellekulturer tilsatt forskjellige konsentrasjoner av 3-MA ble etter endt behandlingstid høstet og sådd ut i koloniforsøk.

Oksygenkonsentrasjonsmålingene var ikke komplette da forsøket ble gjentatt. I ett tilfelle skyldes det at oksygensensoren ikke var tilgjengelig da forsøket ble startet, men fortsatt målte i cellekulturen fra det foregående forsøket. Vi ønsket å se om poc ville falle ytterligere med

lengre behandlingstid. Dessverre stanset sensoren da den stod over helgen, så vi fikk ikke mer informasjon fra dette. I siste forsøk skyldtes den forsinkede igangsettingen av oksygenkonsentrasjonsmålinger at vi dessverre hadde for lite 3-MA igjen på lageret. Vi måtte utsette igangsettingen til etter omsetting/splitting av øvrige cellekulturer forsøksdag 3.



Figur 15. Pericellulær oksygenkonsentrasjon som funksjon av tid angitt i timer, målt i en celleflaske med T-47D-celler dyrket i hypoksi med 5 mM 3-MA tilsatt dyrkningsmediet. Registreringene stopper når forsøket ble avsluttet og celleflasken tatt ut.



Figur 16. Pericellulær oksygenkonsentrasjon som funksjon av tid angitt i timer, målt i en celleflaske med T-47D-celler dyrket i hypoksi med 5 mM 3-MA tilsatt dyrkningsmediet. Registreringene stopper når forsøket ble avsluttet og celleflasken tatt ut. Det er et brudd i registreringen av oksygenprofiler fra omtrent 50 til 75 timer ut i forsøket. Det er usikkert hva dette skyldes, men trolig har sensoren eller programvaren sviktet.

Laveste pericellulære oksygenkonsentrasjoner målt da forsøket ble gjentatt var hhv. 2 % (figur 15) og ca. 0,8 % (figur 16), men registreringene var som nevnt ikke fullstendige.

Det oppsto et brudd i den automatiske registreringen av oksygenprofiler i ett tilfelle, se figur 16. Det er usikkert hva dette skyldes, men trolig har sensoren eller programvaren sviktet.

4 Diskusjon

T-47D-cellers kolonidannende evner ble undersøkt ved ulike dyrkingsbetingelser som ulike konsentrasjoner av O₂ og lavdose bestråling fra [³H]-valin, og i nærvær og fravær av to forskjellige autofagihemmere: CQ og 3-MA.

CQ reduserte celleoverlevelsen i betydelig grad under normoksiske forhold. Med en konsentrasjon på 10 µM CQ i dyrkningsmediet var overlevelsesfraksjonen kun $0,24 \pm 0,079$, høyere konsentrasjoner av CQ i dyrkningsmediet førte til at alle cellene døde. Toksisiteten var konsentrasjonsavhengig, og cellenes inaktivering kom gradvis. Bilder tatt 3 dager ut i forsøket viser at cellene dyrket med konsentrasjoner > 10 µM CQ fortsatt ligger enkeltvis, og har i motsetning til cellene dyrket med 10 µM CQ og uten CQ ikke klart å gjennomføre celledeling. 4 dager ut i forsøket var cellene dyrket med CQ i konsentrasjoner > 10 µM døde. Redusert celleoverlevelse ved disse konsentrasjonene er i samsvar med toksisitet av CQ beskrevet også for andre cellelinjer, f.eks. flere linjer av melanoma (Egger et al. 2013).

Vi gjennomførte også forsøk der lavere konsentrasjoner av CQ ble benyttet. Resultatene peker i retning av at 1 og 5 µM CQ ikke påvirker cellene i samme grad. Dessverre var spredningen så stor at en ikke kan stole på resultatene. Forsøkene var dessuten gjort med et annet oppsett, og funnene ville uansett ikke vært direkte sammenlignbare. Den store spredningen skyldes i hovedsak at forsøksoppsettet var svært tungvint og spredningen kan gjenspeile en eller flere feil ved utførelse av laboratoriearbeidet. Dette oppsettet ble derfor ikke fulgt videre. Vi anser ikke resultatene våre for å være pålitelige for konsentrasjoner < 10 µM.

CQ er vist å ha toksiske effekter gjennom å påvirke flere ulike cellulære mekanismer, hemning av autofagi regnes å være kun én av disse (Homewood 1972, Thomé et al. 2013). Vi antar at den lave overlevelsesfraksjonen vi observerte da vi dyrket cellene i inkubator under normoksiske forhold ikke skyldes hemning av autofagi, men en annen type toksisitet av stoffet. Nøyaktig hva toksiske effekten består i er ikke klarlagt her. På bakgrunn av funnene valgte vi å ikke dyrke celler med CQ under hypoksiske forhold.

Under normoksiske forhold tolererte cellene 3-MA i konsentrasjoner opp til og med 1 mM uten noen doseavhengig inaktivering. Overlevelsesfraksjonen varierer riktignok en del mellom forsøkene og konsentrasjonene, men dette skyldes i hovedsak tellingsusikkerheter ved bruk av Bürkerkammer og variasjonen i overlevelse er i stor grad usystematisk. For eksempel

så vi både høyeste og laveste overlevelsesfraksjon for samme konsentrasjon (10 μ M) av tilsatt 3-MA. Vi anså det å være tilfredsstillende liten effekt av 3-MA i disse forsøkene og valgte å dyrke cellene med 3-MA også under hypoksiske forhold. Vi la til en høyere konsentrasjon (5 mM) når forsøkene skulle gjentas i hypoksi. Fem mM 3-MA ble dermed kun undersøkt under hypoksiske forhold. Det var ingen inaktivering av 3-MA for konsentrasjoner opp til og med 1 mM. Gjennomsnittet for overlevelsesfraksjon var 1,13 – 1,03. T-47D-celler dyrket med 5 mM 3-MA hadde gjennomsnittlig overlevelsesfraksjon 0,71, noe som trolig indikerer en uspesifikk toksisk effekt ved denne konsentrasjonen. Forsøkene i hypoksi ble gjentatt 3 ganger, og resultatene er statistisk signifikante ($SE < 0,05$).

Det var en klar synergieffekt av å kombinere 3-MA med lavdoseratebestråling. T-47D-celler dyrket under hypoksiske forhold med den høyeste konsentrasjonen (5 mM) av autofagihemmeren 3-MA og samtidig bestrålte med 1,6 Ci/mol [3 H]Val ($0,015 \pm 0,004$ Gy/h) hadde en betydelig reduksjon i overlevelsesfraksjon ($SF 0,25 \pm 0,009$) sammenlignet med cellene som ble dyrket under hypoksiske forhold med kun 3-MA i mediet (5 mM 3-MA ga $SF 0,71 \pm 0,025$). Funnet er interessant, og peker mot at 3-MA gir en økt sårbarhet for lavdoseratebestråling. Tidligere forsøk med T-47D-celler dyrket med 4 % O_2 i gassfasen viste at det de første to ukene ikke var observerbar forskjell mellom celler bestrålte med 1,6 Ci/mol og ubestrålte celler, effekten var synlig først etter 3 uker (Pettersen et al. 2007). Det er for begrenset med data innhentet i denne oppgaven til å si noe sikkert. Riktignok er det liten spredning i resultatene (for de 5 parallellene i koloniforsøket var $SE = 0,009$) men forsøket ble kun utført én gang, og må repeteres for å få et bedre datagrunnlag. Vi kan imidlertid anse funnene som en indikasjon på at det er effekt ved kombinasjonsbehandling.

En sentral forutsetning for forsøkene gjennomført under hypoksiske forhold var at oksygenkonsentrasjonen ble lav nok til å utløse cellulære effekter av hypoksi, samtidig som konsentrasjonen ikke ble så lav at cellene ikke var levedyktige. Cellelinjen T-47D er vist å være levedyktig med 4 % O_2 i gassfasen, selv om konsentrasjon pericellulært faller til under 0,1 % (Pettersen et al. 2005). Oksygenkonsentrasjon i gassfasen er ikke et tilstrekkelig mål på poc (Pettersen et al. 2005), og for bedre å dokumentere poc ble det utført målinger av oksygenprofiler. Dessverre er oksygenkonsentrasjonsmålingene fullstendige i kun ett av forsøkene. Her er poc målt ned mot omtrent 0,1 % O_2 på det laveste. De to øvrige oksygenprofilmålingene er mangelfulle. Laveste verdier av målte konsentrasjoner er der hhv. 2 % og ca. 0,8 %. Pericellulær oksygenkonsentrasjon kan ha vært lavere enn det som er

registrert i de to siste tilfellene, men uten målinger blir det noe usikkert nøyaktig hvor streng hypoksien har vært. En pericellulær konsentrasjon på 0,13 % (1 mmHg) O₂ er beskrevet som nederste grense for full respirasjon for ascites tumorceller (Froese 1962), hypoksien trenger imidlertid ikke være så streng for å ha effekt på cellene. Endret signalering observeres ved høyere konsentrasjoner (Simon et al. 2008), blant annet er økning i uttrykk av Hif1 α målbar allerede ved 4 % O₂, og økningen er betraktelig ved 1 % O₂ (Yu et al. 1998, Jiang et al. 1996). Hif1 α inducerer autofagi (Levy et al. 2011). Om oksygenkonsentrasjonen ikke har blitt optimalt lav er det derfor likevel sannsynlig at cellene har vært dyrket under forhold som normalt øker aktiveringen av autofagi.

En kan med fordel gjennomføre forsøk der en måler i hvilken grad autofagi aktiveres hos T-47D-celler dyrket under forhold som i denne oppgaven. Det vil muliggjøre en kvantifisering av hvor godt 3-MA hemmer autofagi i T-47D-celler under de samme vekstbetingelsene. I denne oppgaven er generell toksisitet av stoffet under normoksiske og hypoksiske forhold undersøkt. Vi ville finne høyeste konsentrasjon med null effekt hos celler dyrket i hypoksi. Tanken bak dette var at dersom 3-MA kombineres med lavdoseratebestråling i hypoksi i senere forsøk kan en anse en eventuell økt effekt på cellenes kolonidannende evner å skyldes økt sårbarhet for bestrålingen snarere enn en toksisk effekt av 3-MA alene. Dette så vi en indikasjon på at var tilfelle da vi kombinerte 5 mM 3-MA med 1,6 Ci/mol [³H]Val. Imidlertid har vi ikke noe mål på i hvilken grad konsentrasjonene vi har benyttet av 3-MA har hemmet autofagi i cellelinjen vi har undersøkt. En metode for å måle autofagi er ved uttrykk av LC3, som er vist å korrelere med antall autofagosomer som dannes i pattedyrceller (Kabeya et al. 2000). LC3 egner seg bra som indikator ettersom 3-MA som nevnt hemmer autofagi gjennom å blokkere danningen av autofagosomer. Dette bør gjøres for både konsentrasjonen 1 mM og 5 mM av 3-MA, og gjerne også for konsentrasjoner mellom disse, for eksempel 2, 3 og 4 mM.

Det ble observert ved et par anledninger at celler løsnet fra celleflaskenes bunn i store flak i tiden før omsetting. Dette er et fenomen en har observert også i andre forsøk gjennomført i hypoksiboksen (Christoffersen 2011). Det har blitt stilt spørsmål ved om det kan dreie seg om en metastaserings effekt, der kreftceller løsner fra underlaget og potensielt kan bli transportert til nye områder for der å danne utgangspunkt for nye kreftsvulster. Foreløpig er det imidlertid ikke klarlagt hva denne løsningen av celler egentlig representerer.

5 Konklusjon

Det mest interessante vi fant i disse forsøkene var en indikasjon på synergieffekt, der en så større reduksjon i overlevelsesfraksjonen til T-47D-celler dyrket under hypoksiske forhold når 5 mM 3-MA ble kombinert med lavdoseratebestråling enn om cellene ble dyrket med 5 mM 3-MA eller lavdoseratebestråling alene. Det var liten spredning i resultatene og det anbefales at forsøkene gjentas for å undersøke om funnene lar seg reproducere. Dette forsøket var en mindre del av oppgaven og vi har derfor for lite data til å konkludere.

For autofagihemmeren 3-MA fant vi at 1 mM var høyeste konsentrasjon der gjennomsnittlig overlevelsesfraksjon for T-47D-celler dyrket i hypoksi var 1, og konkluderte med at denne konsentrasjonen ikke virker toksisk på cellene. Det anbefales derfor å benytte denne konsentrasjonen videre til autofagiforsøk i hypoksi. Skulle en ikke se noen effekt av å kombinere 3-MA i denne konsentrasjonen med lavdoseratebestråling anbefaler vi at konsentrasjonen økes til og med 5 mM 3-MA. Selv om det var en grad av inaktivering av cellene i form av reduksjon i kolonidannende evner da vi dyrket med 5 mM 3-MA, var det som nevnt med denne konsentrasjonen vi observerte en synergieffekt.

CQ anbefales ikke benyttet som autofagihemmer i konsentrasjoner fra 10 μ M og oppover grunnet den store og trolig uspesifikke toksisiteten vi observerte hos T-47D-celler dyrket med dette kjemikaliet. Lavere konsentrasjoner kan forsøkes, men eksperimenter fra denne oppgaven gav ikke svar på toksisiteten for konsentrasjoner < 10 μ M.

Litteraturliste

Alberts, B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5th ed. New York: Garland Science; 2008.

Aspmo I. Effekt av lavdoserate β -bestråling på T98G humane kreftceller i kultur. Master i fysikk. 2011. Universitetet i Oslo.

Bártek J, Bárteková J, Vojtěšek B, Stasková Z, Rejthar A, Kovarik J, Lane DP. Patterns of expression of the p53 tumour suppressor in human breast tissues and tumours in situ and in vitro. *Int J Cancer*. 1990 Nov 15;46(5):839-44.

Blommaert E. F. C., Krause U., Schellens J. P. M., Vreeling-Sindelárová H., Meijer A. J. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem*. 1997; 243, 240-246

Brahimi-Horn M. C., Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Letters* 581 2007. 3582–3591

Christoffersen S. Effekt av hypoksiske forhold og lavdoserate β -bestråling på T98G humane kreftceller i kultur. Master i fysikk. 2011. Universitetet i Oslo.

Egger M. E., Huang J. S., Yin W., McMasters K. M., Lacey R., McNally L. R. Inhibition of autophagy with chloroquine is effective in melanoma. *Journal of surgical research* 184 (2013) 274e281

Froese G. The respiration of ascites tumour cells at low oxygen concentrations. *Biochimica et Biophysica Acta*. Volume 57, Issue 1, 1962, Pages 509–519

Goodhead DT. The relevance of dose for low-energy beta emitters. *J Radiol Prot*. 2009 Sep;29(3):321-33

Gordh G., Headrick D. H., “A dictionary of Entomology”, Wallingford: CABI Publishing; 2001.

Gray L. H., Conger A. D., Ebert M., Hornsey S., Scott O. C. A. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 1953;26:638–648

Hall E. J., Giaccia A. J. Radiobiology for the Radiologist. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.

Homewood C. A., Warhurst D. C., Peters W., Baggaley V. C. Lysosomes, pH and the antimalarial action of chloroquine. *Nature* Vol 235. 1972: 50-52.

Horsman M. R., Mortensen L. S., Petersen J. B., Busk M. and Overgaard J. Imaging hypoxia to improve radiotherapy outcome. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. (2012) 9, 674–687

Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol*. 1996;271(4 Pt 1):C1172–80

Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T. et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal* (2000). Vol. 19 No. 21 pp. 5720-5728,

Keydar I, Chen L., Karby S., Weiss F.R., Delarea J., Radu M., Chaitcik S., Brenner H.J.. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *European Journal of Cancer* (1965) Volume 15, Issue 5, May 1979: 659–67

Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature*. September 2005: vol 5: no 9: 726-734.

Konerding MA, Fait E, Gaumann A. 3D microvascular architecture of pre-cancerous lesions and invasive carcinomas of the colon. *Br J Cancer*. 2001 May 18;84(10):1354-62

Levy J. M., Thorburn A., Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes. *Pharmacology & Therapeutics* 131 (2011) 130–141

Liu X.W., Su Y., Zhu H., Cao J., Ding W.J., Zhao Y. C. et al. HIF-1 α -dependent autophagy protects HeLa cells from fenretinide (4-HPR)-induced apoptosis in hypoxia. *Pharmacological Research* 62 (2010) 416–425.

McNamee EN1, Korn Johnson D, Homann D, Clambey ET. Hypoxia and hypoxia-inducible factors as regulators of T cell development, differentiation, and function. *Immunol Res*. 2013 Mar;55(1-3):58-70

Michael B. D., Adams G. E., Hewitt H. B., Jones W. B. G. and Watts M. E. A Posteffect of Oxygen in Irradiated Bacteria: A Submillisecond Fast Mixing Study. *Radiation Research*, Vol. 54, No. 2 (May, 1973), pp. 239-251

Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem*. 2000 Jan 14;275(2):992-8.

Pettersen E. O., Larsen L.H., Ramsing N.B., Ebbesen P. Pericellular oxygen depletion during ordinary tissue culturing, measured with oxygen microsensors. *Cell Prolif*. 2005 Aug;38(4):257-67.

Pettersen E. O., Bjørhovde I., Søvik Å., Edin N. F. J., Zachar V., Hole E.O. et al. Response of chronic hypoxic cells to low dose-rate irradiation. *Int J Radiat Biol*. 2007 May;83(5):331-45.

Seglen P. O., Gordon P. B. 3-Methyladenine: Specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Nati Acad. Sci. USA* 1982; Vol. 79, pp. 1889-1892,

Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Apr; 9(4):285-96.

Skov K. A. Radioresponsiveness at low doses: hyper-radiosensitivity and increased radioresistance in mammalian cells. *Mutation Research* 430 _1999. 241–253

Thomé R., Lopes S. C. P., Costab F. T. M., Verinaud L. Chloroquine: Modes of action of an undervalued drug. *Immunology Letters* 153 (2013) 50– 57.

White E, DiPaola R. S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clinical Cancer Research*. 2009; 15:5308-5316.

Yu A. Y., Frid M. G., Shimoda L. A., Wiener C. M., Stenmark K., Semenza G. L. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol*. 1998 Oct;275(4 Pt 1):L818-26.